

PCT/JP2004/010639

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

29.07.2004

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

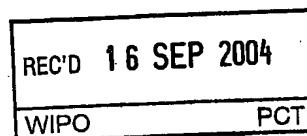
This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application: 2003年 7月30日

出願番号
Application Number: 特願2003-203802

[ST. 10/C]: [JP2003-203802]

出願人
Applicant(s): ビーエイチピーエイチ カンパニーリミテッド

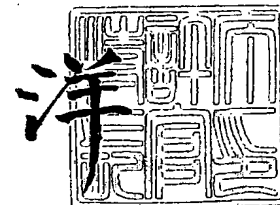


PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年 9月 2日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小川



出証番号 出証特2004-3078723

【書類名】 特許願

【整理番号】 P030730R1

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 A61K 35/74
C12N 1/00

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府富田林市横山166番地の1

【氏名】 ▲はた▼ 忠世

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府大阪市天王寺区六万體町5-23-1201

【氏名】 利森 仁

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府豊中市蛸池中町二丁目1番2号

【氏名】 丸岡 俊之

【特許出願人】

【識別番号】 599011263

【氏名又は名称】 ビーエイチピーエイチ カンパニーリミテッド

【代理人】

【識別番号】 100074561

【弁理士】

【氏名又は名称】 柳野 隆生

【電話番号】 06-6394-4831

【選任した代理人】

【識別番号】 100124925

【弁理士】

【氏名又は名称】 森岡 則夫

【電話番号】 06-6394-4831

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 013240

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】明細書

【発明の名称】新規乳酸菌並びに生体賦活型乳酸菌製剤と生体に対する感染症の予防剤および治療剤

【特許請求の範囲】

【請求項1】下記の性質(1)、(2)、(3)、(4)及び(5)を有することを特徴とするラクトバチラス カゼイ種。

(1) 発育に必要な窒素源として1種類乃至4種類のアミノ酸のいずれか1種の存在により発育が可能であること。

(2) 発育可能な培地に大腸菌と同じ菌数を接種し、37℃で嫌氣的に混合培養したとき、最終菌数が大腸菌の50%以上になること。

(3) 適当な培地で培養したとき、最終pHが4.0以下になり、且つ最高酸度が1.5%以上になること。

(4) 5%の胆汁酸塩に対して抵抗性を有すること。

(5) 抗生物質を産生していること。

【請求項2】請求項1に記載の性質に加えて、以下の性質を少なくとも1種有していることを特徴とするラクトバチラス カゼイ種。

(a) 汎用されている抗生物質に対して抵抗性を有すること。

(b) デンプン分解能力を有すること。

(c) クロレラの発育を促進すること。

(d) 5℃～45℃の範囲の温度域で発育すること。

(e) pH4.0～pH10.0の範囲のpH域で発育すること。

(f) 如何なる酸素分圧においても発育し得ること。

【請求項3】前記ラクトバチラス カゼイ種がFERM P-19443であることを特徴とする請求項1または2に記載のラクトバチラス カゼイ種。

【請求項4】請求項1乃至3のいずれか1項に記載のラクトバチラス カゼイ種を主有効成分とすることを特徴とする生体賦活型乳酸菌製剤。

【請求項5】請求項1乃至3のいずれか1項に記載のラクトバチラス カゼイ種を主有効成分とすることを特徴とする人、動物および植物に対する感染症の予防剤およびその治療剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、従来公知の菌にはない優れた特性を有するラクトバチラス カゼイ種並びに該菌を主有効成分とする健康回復・維持・増進に、また動植物の成長、品質向上に極めて有効な生体賦活型乳酸菌製剤および人、動物および植物の感染症の予防乃至治療に高い効果を示す乳酸菌製剤に関するものである。

【0002】

【従来の技術】

細菌が生体内に侵入して増殖し、その生体が病的症状を現すことを感染症というが、一度細菌が生体内で増殖を始め、それに対して生体が種々の反応を示すと、発赤、腫脹など様々な現象が現れる。この時点で抗生物質などの薬剤の使用が適切であると、その感染症は治癒に向かう。しかし、抗生物質の使用の時期を失したり、使用方法が不適切であったり、治療の途中で薬剤の使用が中断されたり、薬剤が局所に十分に到達しないなどという場合には、病原菌の撲滅乃至排除を妨害して、治療が不成功に終わるケースも多い。これらの要因に加えて、最近では、細菌の側にも、宿主の側にも、問題が生じて、一層事態を複雑にして、感染症は長期化し、あるいは一層悪化して治療の困難な疾病へと転化していく。

【0003】

上記の問題点の第一は、抗生物質の乱用による薬剤耐性菌の出現と、その蔓延にある。20世紀半ばにペニシリンを端緒とする抗生物質の登場により、人類は伝染病との闘いの歴史において、初めて勝利を手にした。これまでの薬剤とは違い、この劇的な効果を示す薬剤は「魔法の弾丸」ともてはやされ、感染症は制圧されたかに見え、「伝染病」という言葉も一時は死語になりかけた。ところが、細菌も簡単には負けていなかった。じっと耐えて力を蓄えた細菌は逆襲に転じたのである。一旦、耐性を獲得した細菌は、R-プラスミドと呼ばれる特別のDNAのかけら（耐性遺伝子）を接合により、種を越えて他の細菌に伝達し、仲間を増やすことに成功した。これが現在院内感染として大問題となっているメチシリン耐性ブドウ球菌（MRSA）をはじめとする多剤耐性のバンコマイシン耐性腸

球菌（VRE）、緑膿菌、結核菌、赤痢菌などの跋扈と蔓延で医療界を正に敗北の瀬戸際に立たせているといっても過言ではない。

【0004】

問題点の第二は、薬剤そのものに関することであるが、薬剤は生体にとっては異物であり、程度の差こそあれ副作用を伴うもので、専門家は効果の高い薬剤ほど副作用が強いと指摘している。一般に老人に対する薬の作用は、「効果は二分の一で副作用は二倍」といわれている。来るべき高齢化社会を考えると、この事実を無視するわけにはいかない。現在は社会全般にわたって「安全性と安心感」が何にもまして声高に叫ばれる時代であることをつとに認識せねばならない。現に副作用による死亡事故は後を絶たない。抗生物質も例外ではなく、ペニシリンショックともいわれるアレルギー反応を手始めに、白血球減少、貧血などの血液毒性は他剤に比べても際立って強く、そのため免疫力を低下させることは、公的機関も認めている事実である。しかし、高い有用性のために、実際には重症か、死亡した場合以外には殆ど問題になることはなかった。

【0005】

さらに、抗生物質には、もう一つ直接目には見えない副作用が隠れている。それは重要な臓器ともいわれている腸内細菌叢への打撃と菌交代現象を引き起こすことにある。すなわち、抗生物質に感受性の高い腸内善玉菌の激減と血液毒性とが相俟って免疫機能の低下をより一層促進し、感染症の慢性化を進めると同時にウイルス性の疾患や新たな感染症を誘発する要因ともなっている。事実、慢性感染症の異型ともいわれる歯周病、副鼻腔炎、痔疾などの原因菌は抗生物質耐性菌であるケースが多く、薬剤は無効で副作用のみ蓄積される。たとえ、感受性であっても抗生物質を多用すればするほど、耐性菌へと変異するリスクは高くなる。これらの事象は、個人的には病原菌による持続的な毒素にさらされ、免疫機能の低下との二重の致命的な障害を受け、社会的には耐性菌は国境を越えて全世界に想像外の害毒を撒き散らすこととなる。

【0006】

欧米に目を転ずると、すでに十数年前から病気になってから治療するのではなく病気にならない体をつくるという考え方（予防医学の重要性）が主流となり、

その有効な手段の一つが安全性の高さに社会からの理解を得て、有益な細菌の力を借りる「プロバイオティクス」として開花した。

【0007】

乳酸菌の研究は、現代微生物学の祖といわれるフランスのパスツールに端を発し、ロシアのメチニコフの不老長寿説を生み、以来幾多の臨床的応用がなされてきたが、真の意味で実用化を獲得することはなかった。これは疫学的調査が示した結果と、実験が明らかにした結果とが、噛み合わなかったからである。しかし、最近にいたり、腸内細菌学の長足の進歩により、乳酸菌は次のような、重要な役割を担っていることが解明されてきた。

- (1) 免疫機能正常化作用：生命維持に不可欠である免疫機能を正常にしたり、高めたりする。
- (2) 腸内浄化作用：腸内細菌叢を整え、有害菌の繁殖を抑え、腸内の異常発酵や有害菌の産生を抑制する。
- (3) 血液の浄化作用：腸内の浄化作用の波及効果で血液も浄化される。
- (4) 食物の栄養価の促進作用：ビタミン、アミノ酸などの合成を促す。腸壁から栄養分の吸収を助ける。
- (5) 有害菌の感染防止作用：外来の有害菌が侵入してきても、腸内での増殖感染を防御する。
- (6) 細胞の正常化作用：細胞のもっている能力の正常化を促す。

【0008】

翻って、日本においても高齢化社会を迎え、医療費の抑制が国家目標となり、疾病予防の重要性が認識され、社会全体が健康志向をもつようになった。それに伴い乳酸菌を素材にした製品は増加の一途をたどり、機能性ヨーグルトと銘打った商品開発も盛んになってきた。しかしながら、実情はこれらの製品を継続して摂取しても、上記(1)～(6)のような作用や、病気や健康に確かな効果を体感しうることは少なく、ましてや感染症に対する有効性については、未知数で期待はずれの感を拭い得ないのである。

【0009】

本発明者らは、これらの現状を踏まえ、従来の抗生物質の弊害、すなわち薬剤

耐性菌、薬剤アレルギー、副作用、常在菌叢にまつわる諸問題を解決し、これからの社会のニーズに応えるべく、2000年5月に本発明者らが分離選択した特異な能力を有する乳酸桿菌を感染症に使用することを提案し、「新規な感染症対応型乳酸菌及び該乳酸菌を主成分とした乳酸菌製剤」と題して、特許出願を行った（例えば、特許文献1参照。）。

【0010】

この乳酸桿菌は、病原菌に対する生育阻害作用のみならず、病原菌の毒性を減弱させる特性を有する「新規な生理活性物質」を産生するラクトバチラス カゼイであって、該菌を主有効成分とする急性及び慢性の感染症に対応し得る乳酸菌製剤に関するものであった。その内容は、自然界から分離採取したラクトバチラス カゼイのうち、抗菌スペクトルの広い抗生物質を産生している菌株のみを選択し、次に該抗生物質が病原菌の毒性減弱性を示すか否か、溶血性、S-R変異、動物実験などで確認しながらスクリーニングし、最終合格したラクトバチラス カゼイの3株、すなわち、FERM BP-6771株、FERM BP-6772株およびFERM BP-6773株を感染症に応用するものであった。また、汎用の抗生物質に対して抵抗性を付与させて、該抗生物質との併用を可能とした。急性大腸炎、急性膀胱炎、急性気管支炎などの急性感染症に対する投与例においては、抗生物質投与に加え、本乳酸菌を使用することによって、(i) 抗生物質の投与量を減少させることができた、(ii) 副作用が少なく症状の緩和が早く回復も早くなった、(iii) 腸内細菌叢の乱れが少ないなど、従来の抗生物質単独の投与に比較して高い治療効果が得られ、薬剤による弊害も軽減された。しかし、歯周炎、副鼻腔炎、気管支炎、痔瘻などの慢性感染症に対しては、効果の発現に時間が掛かる上、完全治癒には至っていない。

【0011】

【特許文献1】

特開2001-333766号公報

【0012】

【発明が解決しようとする課題】

上述のように、治療に難渋する慢性感染症の病巣に定着・増殖し、原因菌を排

除しながら強力な浄化能力を発揮し得るラクトバチラス カゼイの育成が課題となっている。

【0013】

【課題を解決するための手段】

本発明者は、鋭意検討の結果、雑菌の汚染に常に曝されながらも、清浄性を維持している腔内浄化システムに着目し、ヒントを得て、目的を達成することができた。

【0014】

すなわち、下記の性質(1)、(2)、(3)、(4)及び(5)を有することを特徴とするラクトバチラス カゼイ種であって、該ラクトバチラス カゼイ種がFERM P-19443であることが好ましい。

(1) 発育に必要な窒素源として1種類乃至4種類のアミノ酸のいずれか1種の存在により発育が可能であること。

(2) 発育可能な培地に大腸菌と同じ菌数を接種し、37℃で嫌氣的に混合培養したとき、最終菌数が大腸菌の50%以上になること。

(3) 適当な培地で培養したとき、最終pHが4.0以下になり、且つ最高酸度が1.5%以上になること。

(4) 5%の胆汁酸塩に対して抵抗性を有すること。

(5) 抗生物質を産生していること。

【0015】

本発明の第二は、上記に記載の性質に加えて、以下の性質を少なくとも1種有していることを特徴とするラクトバチラス カゼイ種であって、該ラクトバチラス カゼイ種がFERM P-19443であることが好ましい。

(a) 汎用されている抗生物質に対して抵抗性を有すること。

(b) デンプン分解能力を有すること。

(c) クロレラの発育を促進すること。

(d) 5℃～45℃の範囲の温度域で発育すること。

(e) pH4.0～pH10.0の範囲のpH域で発育すること。

(f) 如何なる酸素分圧においても発育し得ること。

【0016】

本発明の第三は、上記に記載したラクトバチラス カゼイ種を主有効成分とすることを特徴とする生体賦活型乳酸菌製剤である。

【0017】

本発明の第四は、上記に記載したラクトバチラス カゼイ種を主有効成分とすることを特徴とする人、動物および植物に対する感染症の予防剤およびその治療剤である。

【0018】

【発明の実施の形態】

本発明にいうラクトバチラス カゼイ種とは、培養によって得られた菌体、培養液そのもの、および除菌した培養液をいう。

【0019】

本発明のラクトバチラス カゼイ種の開発は、腔内に常在している乳酸菌の存在を参考にして行った。すなわち、腔内にはデーデルライン桿菌 (Doederlein's bacillus) が常在して腔壁から浸出してくるグリコーゲンを分解して乳酸をつくり、酸性度を維持して外部から侵入してくる腐敗性の細菌の増殖を防ぎ、その清浄度を保つ上で重要な働きを担っている。この菌はラクトバチラス アシドフィラス (Lactobacillus acidophilus) に近似の菌で、抗生物質などにより発育が抑えられると、酵母や他の細菌が増殖して様々な炎症の原因となりうるがよく知られている。すなわち、腔内の僅かな栄養を糧として定着し、増殖しうる乳酸菌を主体とした感染防御システムが構築されているのである。難疾の痔瘻も腸内細菌叢が善玉菌主体になれば自然に良化する点で、この浄化のシステムは基本的に共通するものである。

【0020】

これらの知見を踏まえて本発明者らは、整腸剤としての乳酸菌製剤や市販の乳酸菌製品をできる限り収集し、系統だって調査・研究した結果、ある幾つかの条件を兼備している菌株のみが、本来顕在的または潜在的に有している能力を100%発揮して、動物および植物の生体を抜本的に活性化し、その成長や品質向上などの経済的効果を発現し、病気に対しては免疫力（自然治癒力）を高めると

同時に感染症の原因菌を強力に排除しうることを見出し、本発明を完成したのである。

【0021】

本発明のラクトバチラス カゼイ種が保持すべき条件とは、まず必須条件として、(1) 栄養要求性が従来公知のラクトバチラス カゼイに比べて著しく低いこと。すなわち、発育に必要な窒素源として1種類のアミノ酸、2種類のアミノ酸、3種類のアミノ酸および4種類のアミノ酸のいずれか1種であっても、発育が可能であることを意味するものである。(2) 生育環境下で増殖速度が速いこと。すなわち、発育可能な培地に大腸菌と同じ菌数を接種し、37℃で嫌気的に大腸菌と混合培養したとき、最終菌数が大腸菌の50%以上になることを意味するものである。(3) 乳酸産生能が高いこと。すなわち、適当な培地で培養したとき、最終pHが4.0以下になり、且つ最高酸度が1.5%以上になることを意味するものである。(4) 胆汁酸に対して高い抵抗性を有すること。すなわち、5%の胆汁酸塩に対して抵抗性を有することを意味するものである。(5) 抗生物質を産生し、他の菌の増殖を抑制し得ることである。

【0022】

さらに好ましくは、(a) 汎用されている抗生物質に対して抵抗性を有すること。(b) デンプン分解能力を有すること。(c) クロレラの発育を促進すること。(d) 発育温度域が広いこと。すなわち、5℃～45℃の範囲の温度域で発育することを意味するものである。(e) 発育pH域が広いこと。すなわち、pH4.0～pH10.0の範囲のpH域で発育することを意味するものである。(f) 発育可能な酸素分圧が広いこと。すなわち、如何なる酸素分圧においても発育し得ることを意味するものである。

【0023】

従って、本発明者らは、先に特許出願したラクトバチラス カゼイ種であるFERM BP-6971, FERM BP-6972 および FERM BP-6973 (以下「オリジナルのラクトバチラス カゼイ種」という。)を馴化育成して、上記の諸性質を付与させることに力を注いだ結果、FERM BP-6971株より本発明に適合した菌株を作出することに成功したので、以下にその経緯を説明する。

【0024】

環境に適応して、しかも病原菌との発育競争に打ち勝ち、自己が十分に増殖しなければ生体に対して影響力を及ぼすことは到底かなわない。そのためには、他菌の発育を抑制する抗生物質を産生していることは必要な要件であるが、まずは菌の基本能力すなわち発育増殖力強いことが肝要である。一般的にラクトバチラス属は栄養要求性が高く、例えば増菌用として広く知られているMRS培地の組成は、1 L中に肉エキス10 g、酵母エキス5 g、ペプトン10 g、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 g、 $MnSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.5 g、酢酸ナトリウム5 g、クエン酸二アンモニウム2 g、 KH_2PO_4 2 g、ブドウ糖20 gを含有したものである。本発明のラクトバチラス カゼイ種も例外ではないが、自然界から分離したラクトバチラス カゼイであるので、元来栄養要求性は中程度であり、「アミノ酸類+ビタミン類+利用できる糖+無機塩類」の適当な濃度の下で増殖可能であり、例えば「[S-W培地]+カザミノ酸1 g+ビタミン0.1 g」の培地をあげることができる。因みに、S-W培地は1 L中に KH_2PO_4 1 g、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.7 g、NaCl 1 g、 $(NH_4)_2HPO_4$ 4 g、 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.03 g、ブドウ糖5 gを含有したものである。この組成で平板培地を作製し、滅菌した生理食塩液に分散したオリジナルのラクトバチラス カゼイ種を塗布して、37℃で48～72時間嫌氣的に培養を行った。出現したコロニーの内、最も大きなコロニーを選択、釣菌し、上記と同様の手順で再び培養を行い、生育してくるコロニーを選択、釣菌するという操作を繰り返し行うことにより、この培地組成で最も発育増殖の早い菌株を捕捉した。次いで、この培地の栄養濃度を1/2にして同様の操作で発育の良い菌株を選択し、さらに栄養濃度を1/4、1/8、1/16へと順次低下させた培地で発育するコロニーを捉えていくことによって、極めて低栄養で、しかもその環境下で増殖力の速い菌株を採取することができた。

【0025】

また、オリジナルのラクトバチラス カゼイ種を含めて、従来公知のラクトバチラス カゼイは、その発育に窒素源として多種類のアミノ酸を要求するが、本発明のラクトバチラス カゼイ種は窒素源として、いずれか1種類のアミノ酸ま

たは2種類乃至4種類のアミノ酸のいずれの場合においても発育が可能になった。例えば、「無機塩類+糖+ビタミン類+(L(+)-リジン塩酸塩+L-グルタミン酸)」をあげることができる。ラクトバチラス カゼイと同様に自然界においてどこにでも生息していて、我々にとっても身近な存在であり、環境汚染の指標菌としても知られている大腸菌とを共存させた場合、本発明のラクトバチラス カゼイ種は初期乃至中期における増殖程度およびその速さは大腸菌に遜色なく、最終菌数の比でも大腸菌1に対して0.5以上となった。なお、菌数比が0.3以下のときは、たとえその菌株が如何にすばらしい能力をもっていたとしても生体への影響力は小さい。

【0026】

次に、他菌との発育競争に打ち勝つためには、環境中のpHを低下させて他菌の発育を抑制することも重要な性質である。すなわち、乳酸菌産生能の強い菌株を育成することである。特に、消化器系統においては、産生する乳酸は外来の各種病原菌の侵入や増殖から生体を守り、副次的には腸の蠕動を亢進させ、腸管内の老廃物の排泄を促すとともに腐敗産物の生成を抑制している。実験の結果、最終pHが4.0以下になることおよび最高酸度が1.5%以上になることが、その乳酸菌の能力を高める上で重要な要件の一つであることが明らかになった。因みに、従来公知のラクトバチラス カゼイの多くは、最終pHが4.2以下にはならず、最高酸度は1.5%未満である。なお、乳酸産生能を高めるための育成方法の一例は、先に記載した1L中に肉エキス10g、酵母エキス5g、ペプトン10g、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2g、 $MnSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.5g、酢酸ナトリウム5g、クエン酸二アンモニウム2g、 KH_2PO_4 2g、ブドウ糖20gを含有した培地に $CaCO_3$ 3gを添加した不透明な培地で37℃において嫌氣的に48～72時間培養し、コロニーを結ばせ、そのコロニーの周囲の透明環が広いものを選択することを繰り返し行うことにより、乳酸産生能の高い菌株を育成した。これは、産生する乳酸により不透明な炭酸カルシウムが乳酸と結合して、透明な乳酸カルシウムに変化することを利用したものである。

【0027】

消化管は1本の管で外界に直接つながっているが、厳しい環境下で生息してい

る自然界の菌が栄養豊富で、しかも環境の穏やかな腸内で定着・増殖できない理由の一つは、胆嚢から分泌される胆汁酸の存在が深く関わっているからである。従って、腸内細菌の分離選択培地の多くは、他菌の発育を抑制するために、胆汁酸を組成成分として添加している。本発明者らの知見によれば、胆汁酸、例えばデオキシコール酸ナトリウム、の濃度 0.1% を境にして腸内細菌は発育するが、腸内非生息菌の多くは発育しない。一方、オリジナルのラクトバチラス カゼイ種は胆汁酸濃度 0.2% まで発育可能であったが、生体での活躍には下記の理由もあって、胆汁酸濃度 0.5% における発育が必要であるとの結論に至った。従って、胆汁酸に対する抵抗性を有する菌株の育成を行ったが、これは常法により実施した。すなわち、乳酸菌の選択培地 LBS や増殖培地 MRS のような高栄養の培地に胆汁酸を 0.2% 添加することから始め、生育する毎に徐々に胆汁酸濃度を 0.5% まで高めていくという方法を採用した。そして、一旦抵抗株になれば培地の種類を問わず、そのまま抵抗性を保持し得ることが確認され、それと同時に胆汁酸抵抗性と粘膜親和性とは相関性を有することが今回の実験の結果新たに判明した。すなわち、胆汁抵抗性が増せば、言い換えれば胆汁酸に対する親和性が増せば腸管以外の粘膜、例えば口腔、鼻粘膜、膣などにも定着性が高まることを意味していた。

【0028】

他菌の生存を阻害するためには抗生物質を産生していることが肝要である。オリジナルのラクトバチラス カゼイ種は、抗菌スペクトルの広い抗生物質を産生し、しかも該抗生物質は他菌の発育を阻害するのみならず、病原菌の毒性を減弱させる作用を報告しており、本発明のラクトバチラス カゼイ種は、その能力をそのまま維持継承させたものである。また、本発明のラクトバチラス カゼイ種は、汎用されている抗生物質に対して抵抗性をもつことが要求されるが、オリジナルのラクトバチラス カゼイ種は、抗生物質に対して抵抗性を有するので、本発明のラクトバチラス カゼイ種は、その能力をそのまま維持継承させたものである。

【0029】

生体内外に定着して生存増殖するためには、自然界の何処にでも豊富に存在し

ているデンプンをエネルギー源として利用できることが望ましい。しかし、殆どのラクトバチラス カゼイはデンプン分解能がなく、あったとしても微弱である。オリジナルのラクトバチラス カゼイ種も例に漏れず、デンプン分解能はなかったが、馴化育成することによって、ブドウ糖や乳糖に対する分解力に変わらぬ高いデンプン分解能力を付与することができ、本発明のラクトバチラス カゼイ種を得ることができた。このデンプン分解能を高めるための育成方法の一例は、1 L中に肉エキス1 g、酵母エキス1 g、ペプトン3 g、NaCl 1 g、 K_2HPO_4 0.5 g、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g、 $MnSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.05 g、酢酸ナトリウム1 g、クエン酸二アンモニウム0.5 g、0.2% BTB 12 ml かなり、pH 7.4である中～低栄養の培地にブドウ糖4.5 g、デンプン0.5 g（糖類の内デンプンの割合10%）を添加して37℃で嫌氣的に48時間培養した。次も同じ培地組成で継代することを繰り返し、デンプンを僅かでも分解したことを確認できたならば、次にデンプンの割合を20%に増大させる。このようにして、継代培養を繰り返しながら糖類の内デンプンの割合を100%まで高め、ブドウ糖の場合と同様に素早く分解し得るように育成した。なお、いずれの培地においても糖類が分解され酸が産生されれば、pHが低下し、培地の色は青色から黄色に変化する。ブドウ糖100%のときと、デンプンを添加している培地とが黄色の深みが変わらなくなるまで、根気よく継代することが肝要である。幸いなことに、慢性感染症の原因菌の多くは、デンプンを分解してエネルギーを獲得することができないので、ラクトバチラス カゼイにこの能力を付与させることは感染症対策として殊に有効な手段である。

【0030】

クロレラは、この地球上で十数億年にわたって光合成を行い、細胞分裂を繰り返し、子孫を殖やして生き続けてきた強い生命力をもった単細胞植物であって、現在の多種多様な植物の先祖に位置付けられている。すなわち、クロレラはいわば地球上の生命の原形であり、源といっても過言ではない。従って、乳酸菌がクロレラの発育増殖を促進させたとするならば、この乳酸菌の産生物質は生物の細胞を賦活させると同時に修復作用を有していることを意味しており、よって細胞集合体である生体に有効に作用することは、自明の理である。数十年前からクロ

レラの代謝産物が乳酸菌の増殖を促進することは知られているが、その逆、すなわち、乳酸菌の代謝産物がクロレラの増殖を刺激するという報告は未だ聞かない。そのため、このクロレラの発育を促進させる能力を高めるための育成方法の一例として、1 L 中にペプトン 5 g、肉エキス 2 g、グルコース 5 g、酵母エキス 5 g、 KNO_3 2 g、 K_2HPO_4 2 g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g、 NaCl 0.1 g、 $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.05 g、 CaCO_3 3 g、寒天 15 g からなり、pH 6.8 である培地を 120℃、15 分間高圧滅菌し、滅菌後 50℃ 前後に冷却した後、純粹培養したクロレラを適量添加し、均一に混和し、シャーレに分注した。照明をつけた孵卵器内で 28℃、48～72 時間先行培養し、その後該培地に滅菌生理食塩液に分散したオリジナルのラクトバチラス カゼイ種を塗布し、照明下で 28℃～32℃ で好気的および嫌氣的 (CO_2 数% 含有) に培養を継続した。24 時間毎に観察して、増殖したラクトバチラス カゼイのコロニー周辺のクロレラが他の部分に比較して密に増殖しているか否かを観察した。僅かでもそのような傾向がみられるコロニーを釣菌することを繰り返し、クロレラの育成を促進させる本発明のラクトバチラス カゼイ種を作成することができた。

【0031】

さらに、発育可能な酸素分圧、温度域、pH 域などが広いことも厳しい環境に適応して生存競争に勝ち残るためには好ましい条件であり、培地を的確に選べば常法の馴化育成方法で可能である。

【0032】

従来公知のラクトバチラス カゼイ、オリジナルのラクトバチラス カゼイ種および本発明のラクトバチラス カゼイ種の相異点を表 1 に示した。表 1 から明らかなように、選択と馴化育成によってスクリーニングした本発明のラクトバチラス カゼイ種は、公知のラクトバチラス カゼイやオリジナルのラクトバチラス カゼイ種にはない特異な性質を併有しているため、本発明のラクトバチラス カゼイ種を生体に使用したとき、食品コーナーや健康食品コーナーに所狭しと並べられている多種多様な乳酸菌製品では到底感じられなかったような鮮烈な効果を体感し得るのみならず、健康回復、維持、増進に極めて鮮明に作用し、動植

物に使用しては品質向上などの経済効果を生み、また感染症に対しても確かな有効性を発現し得るのである。これらのことから本発明の乳酸菌製剤は生体賦活型乳酸菌製剤あるいは動物および植物に対する感染症の予防剤およびその治療剤とすることができる。

【0033】

【表1】

表1. 各種ラクトバチラス カゼイの性質の比較

	従来公知の ラクトバチラス カゼイ	オリジナルのラクトバチラス カゼイ種	本発明のラクトバチラス カゼイ種
栄養要求性	中～高栄養	中栄養	低栄養
アミノ酸の要求度	多種類のアミノ酸を必要とする	多種類のアミノ酸を必要とする	1～4種類のアミノ酸で充分
普通寒天培地での発育	－ ～ ±	＋	＋＋
増殖速度	遅い	中程度	速い
乳酸産生力	＋	＋＋	＋＋＋
Final pH	4.2 <	4.2 <	4.0 >
酸度	1.2 % >	1.2 % >	1.5 % <
胆汁酸抵抗性 (粘膜定着性)	0.1 % 前後 (低)	0.2 % (中)	0.5 % (高)
抗生物質産生能 (毒性減弱型)	－ ～ ＋ (－)	＋ (＋)	＋ (＋)
既知の抗生物質に対する耐性	－	＋	＋
デンプン分解性	－	－	＋＋
クロレラ増殖に対して	関与しない	関与しない	発育を促進させる
発育可能酸素域	微好気～嫌気 好気性では発育が悪い	微好気～嫌気 好気性では発育が悪い	好気～嫌気 全てで発育良好
発育温度域	15～43℃	15～43℃	5～45℃
発育pH域	5.0～7.5	4.5～9.5	4.0～10.0
腸内定着力	－ ～ ±	＋＋	＋＋＋
整腸作用	－ ～ ±	＋	＋＋
病原菌に対して	発育抑制力は微弱	発育抑制力は強い	発育抑止力は非常に強い

【0034】

【実施例】

次に実施例に基づき、本発明を具体的に説明するが、本発明の趣旨はこれに限定されるものではない。なお、製造工程を変えたり、公知の増量剤または賦型剤

を使用することにより、任意の菌数が得られることはいうまでもない。また、各製剤の剤型は粉末状、顆粒状、カプセル剤など通常の剤型を適当な賦型剤とともに適宜採用することができる。

【0035】

(製造例1)

1 L中に、ペプトン10 g、肉エキス5 g、酵母エキス5 g、乳糖10 g、 K_2HPO_4 2 g、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1 g、NaCl1 g、クエン酸二アンモニウム2 g、酢酸ナトリウム5 g、 $CaCO_3$ 3 g、 $MnSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.3 g、 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.03 g、L-シスチン1 gを含有するpH7.2の培地10 Lに本発明のラクトバチラス カゼイ種 (FERM P-19443) を接種し、37℃にて72時間嫌氣的に培養した。培養終了後、培養液をペーパーろ過することにより、 $CaCO_3$ を除去し、ろ液の3 Lを冷蔵保存し、残りの液を遠心分離し、上澄液と菌塊8.4 gを得た。次いで生理的食塩液420 mlで洗浄し、遠心分離することを2回繰り返した。得られた清浄菌塊をスキムミルク70 g、可溶性デンプン20 g、グルタミン酸ナトリウム0.5 g、精製水1000 mlからなる溶液に入れ、攪拌し、常法により真空凍結乾燥し、菌製剤101 gを得た。この菌製剤の菌数を測定したところ、 2.5×10^{10} cells/gであった。ここで得られた製剤は、凍結乾燥菌体 (保護剤を含む) 101 g、培養液3000 ml、培養ろ液 (除菌液) 6700 mlであった。

【0036】

(製造例2)

1 L中に、カザミノ酸3 g、酵母エキス2 g、トマトジュース50 ml、ブドウ糖2 g、NaCl1 g、 KH_2PO_4 1 g、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.7 g、 $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 1 g、Tween 80 0.5 ml、可溶性デンプン0.5 gを含有するpH6.8の培地10 Lに本発明のラクトバチラス カゼイ種 (FERM P-19443) を接種し、30℃にて96時間通性嫌気性にて培養した。培養終了後、培養液の3 Lを冷蔵保存し、残りの7 Lを遠心分離し、上澄液と菌塊5.6 gを得た。次いで、生理的食塩液280 mlで洗浄し、再び遠心分離した。得られた清浄菌塊のうち2.6 gをバレイショデンプン10.4 gによく混和し、冷蔵保存した。

。残りの清浄菌塊 3 g をスキムミルク 15 g、可溶性デンプン 15 g、トレハロース 5 g、シスチン 0.2 g、精製水 500 ml からなる溶液に入れ、攪拌し、常法により真空凍結乾燥して菌製剤 39 g を得た。この菌製剤の菌数を測定したところ、 2×10^{10} cells/g であった。ここで得られた製剤は、凍結乾燥菌体（保護剤を含む）39 g、湿潤菌体（保護剤を含む）13 g、培養液 3000 ml、培養ろ液（除菌液）6700 ml であった。

【0037】

（製造例 3）

1 L 中に、スキムミルク 100 g、トレハロース 1 g を含有する pH 6.8 に調整した培地 5 L に、本発明のラクトバチラス カゼイ種（FERM P-19443）を接種し、37℃にて、72時間通性嫌気性にて培養した。次に該培養液（ヨーグルト）にトレハロース 75 g を添加し、よく攪拌し、常法により真空凍結乾燥して菌製剤 590 g を得た。この菌製剤の菌数を測定したところ、 5×10^9 cells/g であった。ここで得られた製剤は、菌体とスキムミルク発酵産物とを含有するものであった。

【0038】

次に、実施例によって、従来公知のラクトバチラス カゼイ、オリジナルのラクトバチラス カゼイ種および本発明のラクトバチラス カゼイ種について、その効果を比較検討した。

【0039】

（実施例 1）

大腸菌 O-157 とオリジナルのラクトバチラス カゼイ種（FERM BP-6971）との混合培養並びに大腸菌 O-157 と本発明のラクトバチラス カゼイ種（FERM P-19443）との混合培養により、大腸菌 O-157 がラクトバチラス カゼイとの共存下でラクトバチラス カゼイが産生する毒性減弱型抗生物質の影響力による大腸菌 O-157 の S-R 変異の速さとその割合を追跡調査した。培地組成は 1 L 中に肉エキス 5 g、酵母エキス 1 g、ペプトン 5 g、NaCl 2 g、CaCO₃ 1 g 並びにブドウ糖 2 g もしくはデンプン 2 g を添加し、pH を 7.2 に調整した。37℃にて嫌気的に培養を行い、72時間毎に継代培養し、その都度

平板培地に希釈塗布し、出現するコロニーを観察して、S型（原型）と変異したR型（毒性減弱型）とを計測し、その割合を比較調査した。その結果を表2および表3に示した。糖としてブドウ糖を使用した場合は表2から明らかなように、大腸菌O-157はオリジナルのラクトバチラス カゼイ種（FERM BP-6971）との共存下で継代による菌数の変動が大きかった。継代5代目頃からR型が出現し（30%）、以降継代を重ねるにつれてR型の割合が増大し、18代目で全ての菌がR型に移行した。それ以降は継代を続けても再びS型が復活することはない。これに対して、大腸菌O-157は本発明のラクトバチラス カゼイ種（FERM P-19443）との共存下においては、3代の継代で早や5%のR型が出現し、5代では50%、12代の継代では全ての大腸菌がR型に移行した。すなわち、大腸菌O-157はオリジナルのラクトバチラス カゼイ種に比べ、本発明のラクトバチラス カゼイ種の影響を色濃く受けたことを物語っていた。その理由は、双方のラクトバチラス カゼイの増殖力の違いによるものと推察された。

【0040】

【表2】

表2. 糖としてブドウ糖を使用した場合の大腸菌O-157と
オリジナルのラクトバチラス カゼイ種または本発明のラクトバチラス カゼイ種との混合培養の成績

	オリジナルのラクト バチラス種	大腸菌O-157			本発明のラクト バチラス種	大腸菌O-157		
		S型	R型	R型の割合		S型	R型	R型の割合
1代	12×10^9	4.0×10^9	0	0%	1.4×10^9	32×10^9	0	0%
3代	12×10^9	3.5×10^9	0	0%	1.7×10^9	28×10^9	1.5×10^9	5%
5代	15×10^9	2.5×10^9	1.0×10^9	30%	2.0×10^9	1.0×10^9	1.0×10^9	50%
7代	14×10^9	1.1×10^9	1.1×10^9	50%	2.0×10^9	5.0×10^9	1.5×10^9	75%
10代	10×10^9	1.4×10^9	1.6×10^9	55%	1.8×10^9	1.0×10^9	1.2×10^9	90%
12代	12×10^9	9.0×10^8	2.1×10^9	70%	1.5×10^9	0	1.2×10^9	100%
15代	15×10^9	3.5×10^8	2.1×10^9	85%	2.0×10^9	0	8.0×10^8	100%
18代	13×10^9	0	1.5×10^9	100%	2.0×10^9	0	8.0×10^8	100%
20代	14×10^9	0	1.7×10^9	100%	1.8×10^9	0	1.0×10^9	100%

【0041】

糖としてデンプンを使用した場合は表3から明らかなように、大腸菌O-157の増殖力も低下したが、オリジナルのラクトバチラス カゼイ種はそれ以上に増殖が悪くなり、最終の菌数は 5×10^8 cellsにも満たなかった。このような影響力の低下により大腸菌O-157のR型への移行も遅れて、7代の継代で10%、20代の継代でも50%の出現率であった。さらに継代を継続しても、70%を超えることはなかった。一方、本発明のラクトバチラス カゼイ種の増殖力は、ブドウ糖の場合と遜色なく、大腸菌O-157の増殖力は継代毎に低下し、R型の出現は3代で15%、僅か7代で100%になった。

【0042】

【表3】

表3. 糖としてデンプンを使用した場合の大腸菌O-157と
オリジナルのラクトバチラス カゼイ種または本発明のラクトバチラス カゼイ種との混合培養の成績

	オリジナルのラクト バチラス種	大腸菌O-157		本発明のラクト バチラス種	大腸菌O-157		R型の割合
		S型	R型		S型	R型	
1代	5.0×10 ⁴	2.0×10 ⁹	0	0%	1.5×10 ⁹	2.0×10 ⁹	0%
3代	4.0×10 ⁴	2.5×10 ⁹	0	0%	1.4×10 ⁹	1.7×10 ⁹	15%
5代	3.5×10 ⁴	2.2×10 ⁹	0	0%	1.8×10 ⁹	4.0×10 ⁹	70%
7代	3.5×10 ⁴	1.8×10 ⁹	2.0×10 ⁴	10%	2.0×10 ⁹	0	100%
10代	3.0×10 ⁴	1.7×10 ⁹	3.0×10 ⁴	15%	1.7×10 ⁹	0	100%
12代	2.0×10 ⁴	1.5×10 ⁹	5.0×10 ⁴	25%	1.5×10 ⁹	0	100%
15代	2.0×10 ⁴	1.5×10 ⁹	6.0×10 ⁴	30%	1.8×10 ⁹	0	100%
18代	2.0×10 ⁴	1.2×10 ⁹	8.0×10 ⁴	40%	1.7×10 ⁹	0	100%
20代	1.5×10 ⁴	8.0×10 ⁴	8.0×10 ⁴	50%	1.8×10 ⁹	0	100%

【0043】

大腸菌 O-157 のほかに、サルモネラ エンテリティディス (*Salmonella enteritidis*) やシゲラ フレクスネリ (*Shigella flexneri*) についても同様の試験を実施したが、大腸菌 O-157 の場合と同様にオリジナルのラクトバチラス カゼイ種に比較して、本発明のラクトバチラス カゼイ種による R 型への変異は表 4 に示したように極めて速かった。なお、R 型に変異した病原菌の菌株をマウスの経口および腹腔に S 型の菌株の致死量を投与したところ、死亡率は 0 で、毛色、毛並みおよび行動は無投与のマウスと何ら変わるところなく、病原性は殆ど失活していることを確認した。

【0044】

【表 4】

表 4. 混合培養したときの病原菌の R 型の出現割合

継代数	サルモネラ エンテリティディス		シゲラ フレクスネリ	
	オリジナルのラクトバチラス カゼイ種との混合培養	本発明のラクトバチラス カゼイ種との混合培養	オリジナルのラクトバチラス カゼイ種との混合培養	本発明のラクトバチラス カゼイ種との混合培養
5 代	20%	40%	5%	15%
10 代	40%	80%	25%	50%
15 代	55%	90%	35%	70%
20 代	70%	95%	50%	80%
25 代	75%	100%	50%	100%
30 代	80%	100%	55%	100%
35 代	80%	100%	70%	100%
40 代	90%	100%	75%	100%
45 代	95%	100%	80%	100%
50 代	90%	100%	75%	100%
60 代	95%	100%	80%	100%
70 代	100%	100%	85%	100%
80 代	100%	100%	90%	100%
90 代	100%	100%	100%	100%
100 代	100%	100%	90%	100%
110 代	100%	100%	100%	100%
120 代	100%	100%	100%	100%

【0045】

(実施例 2)

オリジナルのラクトバチラス カゼイ種からなる凍結乾燥製剤 2 g (5×10^8 cells/g) を毎日服用することにより、腸内細菌叢のうち善玉菌として知られ

るビヒドバクテリウム (Bifidobacterium) およびラクトバチラスは増加し、逆に悪玉菌として知られるクロストリディウム (Clostridium) およびベーヨネラ (Vellonella) が減少することは既に試験済みであるが、今回本発明のラクトバチラス カゼイ種を健康者 10 名が服用した成績を経時的に 3 ヶ月間測定して比較した。その結果は、表 5 に示したように、オリジナルのラクトバチラス カゼイ種 (FERM BP-6971) を服用した場合には 3 ヶ月後にビヒドバクテリウムは約 90 % 増に、ラクトバチラス カゼイは 150 % 増に、逆にクロストリジウムは 50 % 減に、ベーヨネラは 25 % 減になった。これに対して、本発明のラクトバチラス カゼイ種 (FERM P-19443) を服用した場合には 3 ヶ月後にビヒドバクテリウムは 133 % 増に、ラクトバチラス カゼイは 300 % 増に、これに対してクロストリジウムは 96 % 減に、ベーヨネラは 98.4 % 減になった。すなわち、腸内細菌叢を構成する善玉菌、悪玉菌に及ぼす作用は、本発明のラクトバチラス カゼイ種の方が数段優れていることが確認された。特に悪玉菌を激減させる能力には秀でたものがあった。

【0046】

【表5】

表5. 健康者の腸内細菌叢の推移

	オリゴ糖の添加あり 他'イ種				本発明の添加あり 他'イ種			
	服用前	服用後の菌の消長			服用前	服用後の菌の消長		
		1ヶ月	2ヶ月	3ヶ月		1ヶ月	2ヶ月	3ヶ月
善玉菌								
ビヒドバクテリウム	1.1×10^{10}	1.3×10^{10}	1.9×10^{10}	2.0×10^{10}	1.2×10^{10}	1.8×10^{10}	2.5×10^{10}	2.8×10^{10}
ラクトバチラス	2.0×10^7	2.5×10^7	3.2×10^7	5.0×10^7	2.5×10^7	5.0×10^7	8.0×10^7	1.0×10^8
悪玉菌								
クロストリディウム	1.0×10^3	8.0×10^3	7.0×10^3	5.0×10^3	1.2×10^3	5.0×10^3	1.0×10^3	3.0×10^3
ペーヨーネラ	7.0×10^3	6.0×10^3	5.0×10^3	4.5×10^3	6.0×10^3	1.0×10^3	2.0×10^3	1.0×10^3

【0047】

次に、病弱者10名に前記ラクトバチラス カゼイの凍結乾燥剤を投与して、経時的に3ヶ月間測定して比較した。その結果を表6に示した。投与前の腸内細菌叢は、表5および表6からわかるように健康者は病弱者に比べて善玉菌は約2倍多く、反対に悪玉菌は3分の1に過ぎなかった。このことは腸内細菌叢の現状が、現在の健康状態を反映していることを如実に物語っている。被験者にアンケート調査を実施したところ、本試験に参加した健康者全員が、より健康になったことを自覚し、病弱者は健康に自信を持てるようになったという報告を受けた。具体的には、(1) 疲労感の減少、(2) 血色がよくなった、(3) 便通異常が改善された、(4) 肌に張りが戻り、美しくなった、(5) 肥満が改善された、(6) 高血圧が正常値に戻った、(7) アトピーが可成り改善された、などであるが、この割合は本発明のラクトバチラス カゼイ種を服用した者が断然多かった。

【0048】

【表6】

表6. 病弱者の腸内細菌叢の推移

	オジサルノのラクトバチラス 他イ種				本発明のラクトバチラス 他イ種			
	服用前	服用後の菌の消長			服用前	服用後の菌の消長		
		1ヶ月	2ヶ月	3ヶ月		1ヶ月	2ヶ月	3ヶ月
善玉菌								
ビヒドバクテリウム	5.0×10^7	5.2×10^7	6.0×10^7	6.5×10^7	4.0×10^7	6.0×10^7	8.0×10^7	1.0×10^{10}
ラクトバチラス	1.0×10^7	1.2×10^7	1.5×10^7	2.5×10^7	1.0×10^7	1.5×10^7	2.0×10^7	4.0×10^7
悪玉菌								
クロストリディウム	7.0×10^7	6.0×10^7	6.0×10^7	4.0×10^7	5.0×10^7	8.0×10^7	2.0×10^7	8.0×10^7
バーヨネラ	2.0×10^6	1.7×10^6	1.5×10^6	1.3×10^6	2.5×10^6	1.0×10^6	5.0×10^6	2.5×10^6

【0049】

(実施例 3)

水カビ病の初期症状を示している平均体長 4.2 cm のキンギョ (和金) 45 尾を無添加区、対照区および試験区の 3 群に分け、各々の群の飼育水温を 15℃、20℃および 25℃に設定し、計 9 個の水槽を使用して 2 ヶ月間観察した。各水槽には 5 L の水にキンギョ 5 尾を入れて飼育した。対照区には、オリジナルのラクトバチラス カゼイ種 (FERM BP-6971) の凍結乾燥菌体 1 g (5×10^6 cells/ml 水槽水) を隔日に投与した。試験区には、本発明のラクトバチラス カゼイ種 (FERM P-19443) の凍結乾燥菌体 1 g (5×10^6 cells/ml 水槽水) を隔日に投与した。無添加区には、何らの処置も行わずキンギョを飼育した。飼育の結果を表 7 に示した。表 7 からわかるように、無添加区においては、水温に関係なく、1 ヶ月未満で全てのキンギョが死亡し、その平均生存日数は 18 日であった。一方、オリジナルのラクトバチラス カゼイ種を投与した対照区では、水温が 25℃の水槽では、1 ヶ月未満で全てのキンギョが死亡し、その平均生存日数は 23 日であったが、15℃および 25℃に設定した水槽では、水カビの繁殖が遅いためか、キンギョの死亡も先に延び、15℃では 1 ヶ月後に 2 尾、2 ヶ月後にさらに 2 尾死亡し、死亡率は 80%であった。また、20℃では 1 ヶ月後に 2 尾、2 ヶ月後に全て死亡し、死亡率は 100%であった。これに対して、本発明のラクトバチラス カゼイ種の場合には、20℃の水温で飼育したキンギョは 45 日目に 1 尾死亡し、25℃の水温で飼育したキンギョは 25 日目に 1 尾、50 日目に 1 尾死亡したが、それ以外は全て元気で体表面に付着していた水カビも殆ど目立たなくなるまでに減少した。成長も健康なキンギョに変わらぬ成長率を示した。このことは、15℃という低温にもかかわらず、低温に馴化させた本発明のラクトバチラス カゼイ種が有効に作用したことを示すものである。

【0050】

【表 7】

表 7. キンギョにおける水カビ病に対する治験成績

水温	区分	1ヶ月後	2ヶ月後	死亡率
15℃	無添加区	5尾死亡		100%
	対照区	2尾死亡	2尾死亡	80%
	試験区	全て生存 平均体長 4.4 cm	全て生存 平均体長 4.5 cm	0%
20℃	無添加区	5尾死亡		100%
	対照区	2尾死亡	3尾死亡	100%
	試験区	全て生存 平均体長 4.4 cm	1尾死亡	20%
25℃	無添加区	5尾死亡		100%
	対照区	5尾死亡		100%
	試験区	1尾死亡 平均体長 4.5 cm	1尾死亡	40%

【0051】

(実施例 4)

キンギョの傷口からエロモナス菌が侵入して、周辺の筋肉を溶解させ、重症の場合には内臓が露出する通称「穴あき病」に罹ったキンギョ（和金）5尾ずつを対象として実施例 3 と同様に設定した水槽で飼育試験を実施した。キンギョの穴あき病の症状は軽度のものから中程度のものまで様々であったが、バランスよく各水槽に入れて 2 ヶ月間飼育した。その結果を表 8 に示した。表 8 からわかるように、無添加区のキンギョは水温に関係なく、症状が進行して、2 ヶ月以内に内臓を露出して全て死亡した。一方、オリジナルのラクトバチラス カゼイ種 (FERM BP-6971) を添加した対照区においては、その症状が軽度のキンギョは水温の低いときは現状維持で、水温の高いときは症状がゆっくり進行し、結局は 2 ヶ月後には 60～80% の高率で死亡した。これに対して、本発明のラクトバチラス

カゼイ種 (FERM P-19443) を添加した試験区では、その症状が軽度の場合には水温に関係なく、ほぼ完治した。中程度の症状の場合も徐々に傷口が癒えて、2 ヶ月間経過しても死亡したキンギョはいなかった。

【0052】

【表 8】

表 8. キンギョにおける穴あき病に対する治験成績

水温	区分	1ヶ月後	2ヶ月後	死亡率
15℃	無添加区	症状が軽度のキンギョも次第に傷口が広がり3尾死亡した。	症状が軽度のキンギョも傷口が広がり残りの2尾も死亡した。	100%
	対照区	症状が軽度のキンギョは現状を維持し、中程度のものは僅かに傷口が広がった。	症状が軽度のキンギョは現状を維持し、中程度のものは全て死亡した。	60%
	試験区	症状が軽度のキンギョは1ヶ月後には傷口が殆ど塞がり、中程度のものは現状維持か、少し傷口が塞がった。	症状が軽度のキンギョは完全に健康状態を取り戻し、中程度のものは傷口があまり目立たなくなった。	0%
20℃	無添加区	15℃の場合とよく似た経過を示し、症状が軽度のキンギョ1尾、中程度のもの2尾が死亡した。	15℃の場合とよく似た経過を経て、残りの2尾も死亡した。	100%
	対照区	症状が軽度のキンギョは現状を維持し、中程度のものは傷口が少し広がった。	症状が軽度のキンギョ1尾も急速に傷口が広がって死亡し、中程度のもの2尾も死亡した。	60%
	試験区	15℃の場合と同じ経過を示した。	15℃の場合と同じ経過を示した。	0%
25℃	無添加区	症状が軽度のキンギョも急速に傷口が広がり、全てのものが死亡した。		100%
	対照区	症状が軽度のキンギョも傷口が広がり、中程度のものも傷口が少しずつ広がった。	症状が軽度のキンギョも急激に傷口が広がり2尾死亡し、中程度のものも2尾死亡した。	80%
	試験区	症状が軽度のキンギョは現状を維持し、中程度のものは傷口が徐々に小さくなった。	症状が軽度のキンギョは傷口が目立たなくなり、中程度のものは1尾を除き傷口がかなり小さくなった。	0%

【0053】

(実施例 5)

W600mm×D200mm×H150mmのプランターを3個用意し、通常の畑の土に完熟堆肥100gおよび化成肥料（日本合同肥料株式会社製、グリーンマップ、N：8%、P：5%、K：5%）12gを混和したものを各々のプランターに入れ、苦土石灰（株式会社ナック製、消石灰に酸化マグネシウムを5～

7%混和した土壌改良剤) 10 gを撒布した。次いで、5~8 mmの深さの溝をつくり、ハツカダイコンの種を筋蒔きした。5日目に発芽したので、その翌日に対照区にはオリジナルのラクトバチラス カゼイ種 (FERM BP-6971) を製造例2に記載の培地で培養した遠心菌塊 2 gを水 200 mlに投入し、よく攪拌した後、撒布した。また、試験区には本発明のラクトバチラス カゼイ種 (FERM P-19443) を製造例2に記載の培地で培養した遠心菌塊 2 gを水 200 mlに投入し、よく攪拌した後、撒布した。なお、無添加区には水のみを撒布した。本葉が出た10日目頃に5 cm間隔に間引きし、各プランターにハツカダイコン 30本ずつを残した。対照区および試験区には、それぞれ上記の遠心菌塊の懸濁液と500倍に希釈した液肥を150 ml撒布し、無添加区には500倍に希釈した液肥を150 mlのみを撒布した。その後は乾燥しないように適宜水を撒いて28日目に収穫した。その成績は表9に示したように、試験区の本発明のラクトバチラス カゼイ種の撒布によって、無添加区のハツカダイコンはいうに及ばず、対照区のオリジナルのラクトバチラス カゼイ種を撒布して育成したものに比較しても、その重さや色つや、香り、肉質、味、歯ごたえなど、各品質において、優れたものを収穫することができた。

【0054】

【表9】

表9. ハツカダイコンの生育成績

区分	生長の経過	重さ (平均g/個)	品質		
			色つや	品 香り	肉質 味
無添加区	30本育った内2本は途中で弱り、 5gの重さしかなかった。	8.1g	鮮紅色	+	少々「す」が 入る。また割 れもある。
対照区	葉もよく繁った。 収穫せずにそのまま放置すると 「す」が入った。	7.2g	鮮紅色	+ ~ ++	緻密な肉質で ある。
試験区	葉も青々と色つやよく繁った。 収穫せずにそのまま放置しておい ても「す」が入ることはなかった。	11.8g	深紅色	++	非常に緻密な 肉質で藍ごた えがある。

【0055】

(実施例6)

貝割れ大根の水耕栽培についても、実施例5と同様の試験区を設けて生育試験を実施した。ポリエチレン製のW100×D100×H180mmの箱の底にスポンジを敷き、水に充分浸し、一面に貝割れ大根の種を蒔いた。温度は22℃に設定し、5日間黒布で覆い、光を遮断し、その後は布を取り払い、自然光にて育生した。対照区にはオリジナルのラクトバチラス カゼイ種 (FERM BP-6971) の凍結乾燥菌体1gを水100mlに投入し、よく攪拌した後、3日目と5日目に霧吹きにて撒布した。また、試験区には本発明のラクトバチラス カゼイ種 (FERM P-19443) の乾燥菌体1gを水100mlに投入し、よく攪拌した後、3日目と5日目に霧吹きにて撒布した。なお、無添加区には水のみを撒布した。生育結果は表10に示したように、本発明のラクトバチラス カゼイ種の撒布によって、無添加区や対照区にはない良質の貝割れ大根を収穫できた。

【0056】

【表10】

表10. 貝割れ大根の生育成績

区分	生長の経過	品 質
無添加区	平均の高さ 15.2cm 外側の茎は高く、内側の茎はかなり低い。	歯ごたえ：並 緑と黄緑はややぼけた色である。 中途半端な辛さである。
対照区	平均の高さ 16.1cm 外側の茎は高く、内側の茎はかなり低い。	歯ごたえ：並～良 緑と黄緑の区分は鮮やかである。 辛さが際立っている。
試験区	平均の高さ 16.8cm ほぼ揃って高くなり、茎はやや太くしっかりしている。	歯ごたえ：良 色つや、緑、黄緑、白の区分は非常に鮮やかである。 辛さの中にもマイルドな甘味が存在する。

【0057】

実施例1～6から明らかなように、オリジナルのラクトバチラス カゼイ種の特質を生かしつつ、馴化育成により各種の性質を付与させた本発明のラクトバチラス カゼイ種は生体に対して計り知れない生命力を賦活することが確認され、オリジナルのラクトバチラス カゼイ種とは基本的且つ根本的に異なる菌株であることが実証された。さらに、臨床試験例を紹介するが、本発明の趣旨はこれら

の実施例に限定されるものではない。

【0058】

(実施例 7)

急性感染症のうち、原因菌が同じでしかも類似の症状を呈している急性大腸炎、急性膀胱炎および結膜炎の患者 15 名ずつをそれぞれ 5 名ずつの 3 グループに分けた。各グループの治療方法は、A グループは抗生物質のみ 1000 mg/日を 5 日間の投与、B グループは抗生物質 500 mg/日を 5 日間投与するとともに、製造例 1 の方法で製造した該抗生物質に耐性の本発明のラクトバチラス カゼイ種 (FERM P-19443) の凍結乾燥菌製剤 2 g/日 (5×10^{10} cells/日) の 10 日間の投与、C グループは初めに抗生物質のみ 1000 mg/日投与し、急性症状が緩和された時点で投与を中止し (通常 2 ~ 3 日程度)、B グループと同様の凍結乾燥菌製剤 2 g/日を 7 日間投与した。10 日間にわたる各グループの治療成績を平均化して表 11 に示した。表 11 から明らかなように、急性感染症の対処法として従来の抗生物質投与に加え、本発明の乳酸菌製剤を併用することによって、あるいは抗生物質投与後に本発明の乳酸菌製剤を服用することによって、(a) 抗生物質の投与量を二分の一にできる、(b) 症状の軽減、緩和、消失が大幅に短縮され、副作用も殆ど感じられず、患者の負担が大幅に軽減することができ、(c) 腸内細菌叢の乱れや菌交代現象が殆どない、など従来の抗生物質一辺倒の治療に比較して耐性菌の出現などの諸問題も含めて、そのメリットは大きい。このように、急性感染症の場合は、下記に示す比較例 1 のオリジナルのラクトバチラス カゼイ種による治療成績 (原因菌や症状は多少異なる) と類似の成績であった。

【0059】

【表11】

表11. 本発明のラクトバチラス カゼイ種による
急性感染症に対する治療成績

病名	主な原因菌	使用抗生物質	治療方法	各5名の症状の経過及び治療成績	腸内細菌叢の乱れ ¹⁾
急性大腸炎	病原性大腸菌	セファクロルCCL	A	下痢、腹痛などの症状の改善には3日を要した。原因菌は4日で殆ど検出されず、完全回復したと認められるには、6・5日を要した。	++
			B	下痢、腹痛などの症状の改善には2・5日を要した。原因菌は4日で検出されず、その時点で食飲、便の状態から判断して、完全回復したと思われた。	±
			C	抗生物質の投与は2日間で、その後本乳酸菌製剤のみ投与した。症状の消失と完全回復は5日目に達成した。	-
急性膀胱炎	肺炎桿菌	ミノサイクリンMINO	A	微熱、排尿痛、頻尿などの症状の緩和には5日を要した。尿の混濁は7日続いた。原因菌は投与4日で検出されず、排尿痛及び残尿感はしばらく残り完全回復には10日を要した。	++
			B	抗生物質投与3日目で原因菌は検出されず、7日目には排尿痛や残尿感が消失した。	±
			C	抗生物質投与4日で起炎菌は検出されず、それ以降本乳酸菌製剤のみ投与した。排尿痛や残尿感は7日目に消失した。	-
流行性結膜炎	黄色ブドウ球菌	オフロキサシンOFLX	A	抗生物質入り点眼薬を投与した。目の充血、疲労、かすみ目などの症状の消失には7日を要した。また、原因菌の消失には4・5日を要した。なお、完全回復には約2週間かかった。	-
			B	抗生物質入り点眼薬を滴下した後、乳酸菌を懸濁した水溶液で目を洗浄する方法を採用した。原因菌の消失にはAと同様4・5日を要したが、症状の消失には、5・5日で、僅か1週間で完全回復した。	-
			C	原因菌の検出で治療成績は、上記AグループとBグループとの間であった。完全回復には10日間を要した。	-

- 1) ++: 腸内細菌の全体数が急減し、また腸内細菌叢を形成する各菌属の勢力図が一時的にせよ大きく崩れる。
 +: 腸内細菌数が、かなり減少し、また、腸内細菌叢を形成する各菌属の勢力図が一時的にせよ多少崩れる。
 ±: 多少変動する位で大勢に影響なし。
 -: 特に変動なし。

【0060】

(比較例1)

実施例 7 と同じく、急性感染症のうち、原因菌が同じでしかも類似の症状を呈している急性大腸炎、急性膀胱炎および急性気管支炎の患者 15 名ずつをそれぞれ 5 名ずつの 3 グループに分けた。各グループの治療方法は、A グループは抗生物質のみ 1000 mg/日を 5 日間の投与、B グループは抗生物質 500 mg/日を 5 日間投与するとともに、製造例 1 の方法で製造した該抗生物質に耐性のオリジナルのラクトバチラス カゼイ種のうち、FERM BP-6972 の凍結乾燥菌製剤 2 g/日 (5×10^9 cells/日) の 10 日間の投与、C グループは初めに抗生物質のみ 1000 mg/日投与し、急性症状が緩和された時点で投与を中止し (通常 2 ~ 3 日程度)、B グループと同様の凍結乾燥菌製剤 2 g/日を 7 日間投与した。10 日間にわたる各グループの治療成績を平均化して表 12 に示した。なお、本比較例 1 は特開 2001-333766 号公報の試験例 1 (表 6) に該当するものである。

【0061】

【表12】

表12. オリジナルのラクトバチラス カゼイ種による
急性感染症に対する治療成績

病名	主な原因菌	使用抗生物質	治療方法	各5名の症状の経過及び治療成績	腸内細菌叢の乱れ ¹⁾
急性大腸炎	カンピロバクター	エリスロマイシン E M	A	発熱、下痢、腹痛などの症状の改善には、2.5日要し、原因菌は約3.5日で殆ど消失した。回復には7日の日数を要したが、1例では、その時点で未だ軟便状態が継続していた。	++
			B	上記症状の改善には、3日を要し原因菌の消失には、5日間を要したが、その時点で回復したと判断できた。	±
			C	Aと同様の経過を示したが、患者の顔色、動作、便の状態、食欲などを含めた総合的な判断で回復状態が最もよかった。	-
急性膀胱炎	病原性大腸菌	セファレキシシン C E X	A	投与3日で原因菌は検出されず、微熱、排尿痛、頻尿などの症状の消失には6日を要した。但し、排尿痛はしばらく残り完全な回復には約10日間を要した。	++
			B	Aと同様、投与3日で原因菌は検出されず、排尿痛を含めた症状の消失には5日を要した。	±
			C	Bと類似の経過を経たが、排尿痛の消失には6.5日を要した。	-
急性気管支炎	肺炎球菌	セファクロル C C L	A	原因菌が治療期間中に完全に消失するには到らなかったが、発熱、咳、喉の痛みなどのかぜ症候群は5日でほぼ治まった。しかし、完全回復するには約10日間要した。	++
			B	Aと同様、原因菌は完全に消失することにはなかったが、検出菌量は最も少なかった。かぜ症候群は4.5日でほぼ治まった。完全回復には7日間を要した。	±
			C	原因菌の検出量も治療成績もAとBの間であった。	-

- 1) ++: 腸内細菌の全体数が急減し、また腸内細菌叢を形成する各菌属の勢力図が一時的にせよ大きく崩れる。
 +: 腸内細菌数が、かなり減少し、また、腸内細菌叢を形成する各菌属の勢力図が一時的にせよ多少崩れる。
 ±: 多少変動する位で大勢に影響なし。
 -: 特に変動なし。

【0062】

歯周病の発生機序には、従来から諸説あるが集約された学説としては歯垢（ブ

ラク)の蓄積に起因する慢性炎症性疾患とされている。歯垢は多種類にわたる細菌の集合体であり、その産生する毒素が歯肉に炎症を起こし、それが進行すれば次第に歯茎と歯の隙間である歯周ポケットを押し広げ、口臭を伴い、ついには歯根膜や歯槽骨などの歯の支持組織を破壊する。それが周囲の歯にも次々と感染し、放置すれば全部の歯が抜け落ちてしまうという病気で成人の80%は程度の差はあれ、この歯周病を患っており、現在も根治に難渋している典型的なモデルとして認識されている。主要な起炎菌として、*Porphyromonas gingivalis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella intermedia*などが存在するが、食中毒菌のように毒素を産生せず、そのための自覚症状のないまま進行し、気付いたときには治療が手遅れになっているケースが多い。また、口腔内は常に細菌に汚染される場で、その繁殖には好環境で、それ故何度も再発を繰り返すことに加え、歯周病を確実に治療できる歯科医が残念ながら少ないことが挙げられる。この病巣が奥深いところにつくられ、膿がいつまでもじくじくでる様は痔瘻とよく似た症状で、図らずも消化器官の入口と出口に根治の難しい感染症が発現するのには、何らかの因果関係が存在することを示唆している。この歯周病の予防および治療方法の基本は、(1)ブラッシングのできる限り歯垢とその残骸である歯石を取り除くことで、最近では、超音波レーザーで効率よく破壊・除去したり、特殊な薬液で溶解させる方法も採用されている(細菌の巣の除去)。(2)その後、炎症部位が改善されるまで、消毒液や抗生物質または消炎酵素剤を歯周ポケットに注入したり、服用して、炎症を抑制し、改善を図る。(3)病巣が深部に及んで上記(1)および(2)の治療のみでは好転しない場合には、外科的手術により炎症部や崩壊部を切除する。(4)その後、歯肉を縫合したり、人工部材を入れて形成する。最新では、エナメル発生タンパクを主成分とする薬を注入し、歯周組織の再生を促すことも試みられている。(5)いずれの治療も困難なときは、抜歯して整形する。要するに、歯茎の炎症を抑え、歯周病の進行を阻止し、失われた歯周組織を再成させて審美性を改善し、さらには新たに獲得された治癒組織を維持することを目的としている。

【0063】

(実施例8)

歯周病患者 20 名を 1 グループ 5 名として A～D の 4 グループに分け、全患者のプラークおよび歯石をできる限り除去（ステーリング・ルートプレーニング操作）した後、歯周ポケットに抗生物質軟膏または少量の水で練ってゲル状にした本発明の凍結乾燥菌体を充填させる方法を採用した。A グループでは、抗生物質のみを投与または症状に応じて、消炎酵素剤も併用した。B グループでは、抗生物質とともに製造例 1 で製造した凍結乾燥菌製剤と製造例 3 で製造した菌製剤とを等量ずつ混合した製剤とを併用した。C グループでは、初期の段階は抗生物質または消炎酵素剤とを投与し、その後は上記菌製剤を使用した。D グループは、治療当初から抗生物質は一切用いず、菌製剤のみを投与した。なお、治療に当たり、主要な原因菌を分離し、薬剤感受性テストを行い、その結果を踏まえて各々最適な抗生物質を使用した。その結果を表 13（表 13-1 および表 13-2）に示した。表 13 から明らかなように、抗生物質や消炎酵素剤の投与のみでは、効果は殆ど期待できない歯周病に対しても、本発明の乳酸菌製剤の単独または抗生物質などとの併用によって、半月を経ずして原因菌は駆逐され、1～2 ヶ月間続けることによって、個人差はあっても、口臭の消失、歯肉の状態、歯周ポケット内の状態、歯のぐらつき状態などが改善され、従来の治療には到底認められなかった有効性を発揮した。このように、歯周病の場合は、下記に示す比較例 2 のオリジナルのラクトバチラス カゼイ株による治療成績に比較して一段と良好に推移して、特筆すべきは、歯周ポケットの歯肉の盛り上がりや締まりに顕著な作用が認められた。

【0064】

【表 13】

表13-1. 本発明のラクトバチラス・カゼイ種に対する治療成績

治療方法	患者		歯周病の程度	主な原因菌	抗生物質(略名)	投与期間	治療経過と成績
	名前	年齢 性別					
A	W.S.	48 ♀	浅部 3 5	Ps.gingivalis C. rectus	ミノサクリン MINO		2週間投与したが、殆ど改善されず。但し、腫脹は幾分改善され、その他の症状の進行も停止している様子。現状維持。
	K.K.	72 ♂	中部 2 4 5 6	Ps.gingivalis F. nucleatum	ミノサクリン MINO		2週間投与したが全く改善されなかった。口臭、腫脹は相変わらず認められた。但し、膿の量は僅かだが減少した様子がみられた。
	M.T.	62 ♂	深部 5 6	Ps.gingivalis B. forsythus	セファクロ CCL		3週間投与したが殆ど改善されなかった。口臭もきつい。歯肉の色調も赤黒く、腫れた状態が相変わらず続いた。排膿、出血量も殆ど改善されなかった。
B	A.I.	58 ♀	浅部 2 3	Ps.gingivalis	セファクロ CCL	30日	投与3日目頃より僅かずつ食化し、口臭は3日目には消失し、15日目で歯肉の色調も腫れもかなり良くなった。30日目で歯周ポケットもかなり塞がり、継続することによって、完全治療が期待できた。
	H.T.	52 ♂	中部 4 5	Sta.aureus Fuso.nucleatum	ミノサクリン MINO	30日	投与7日目頃より症状が軽快し始め、排膿も出血もほぼ止まった。歯周ポケットも幾分縮小したが、いまだしの感である。しかし、歯周も締まり、固いものも充分噛めるようになった。
	M.H.	64 ♂	深部 3 5	Ps.gingivalis A.actinomy- cetemcomi- tuns	ミノサクリン MINO	30日	投与5日目頃より原因菌は消滅し、7日目頃より症状は軽快し、10日目には排膿も出血も止まったと同時に口臭も軽快した。15日目頃より腫れも徐々に退き、色調も良くなり、歯周ポケット内も少し盛り上がり、歯肉もすっかり締まってきた。治療を継続することにより、抜歯もせずに治療が期待できた。

【0065】

【表14】

表13-2. 本発明のラクトバチラス カゼイ種に対する治療成績

治療方法	患者		歯周病の程度	主な原因菌	抗生物質 (略名)	投与期間	治療経過と成績
	名前	年齢 性別					
C	O.M.	60 ♀	浅部 3 5	B. forsythus Ps. intermedia	アモキシリン AMPC 5日間 投与	30日	抗生物質投与期間は殆どなかったが、乳酸菌投与後急速に良くなり10日目には歯肉の色調も回復し、腫脹もほぼ消失した。
	S.K.	49 ♀	中部 2 3 4	Ps. gingivalis	セフトラザイド CCL 5日間 投与	30日	抗生物質投与期間も僅かずつ良化の傾向を示していたが乳酸菌投与後、その回復基調は速くなり10日目には口臭も排膿・出血とも止まった。30日目には歯周ポケットも半分位の容積となった。
	M.K.	63 ♂	深部 5 6	Ps. gingivalis Str. pyogenes	メトロニダゾール TC 7日間 投与	30日	抗生物質投与期間は殆ど変化は感じられなかった。乳酸菌投与後は徐々に良化の傾向を示し、15日目には腫れも徐々に退き始め30日目には歯のグラツキも収まり歯肉も弾力性を取り戻し、色調も非常に良くなった。歯周ポケットも幾分浅くなり、治療も期待できた。
D	O.Y.	72 ♀	浅部 5	A. actinomycetemcomitans		60日	投与7日目頃より僅かずつ良化の傾向を示し始めた。起炎菌は15日目には消失したが、60日目においては歯周ポケットは僅かに残存したが、本発明の乳酸菌製剤投与を続けることにより完全治療が期待できた。
	K.Y.	52 ♂	中部 5 6	Ps. gingivalis Sta. aureus		60日	投与10日目頃より良化し始め、15日目には口臭も消失し、原因菌もみられなくなった。30日目には歯肉の色調も良くなり締まってきた。歯周ポケットも幾分か浅くなり、投与を継続することにより、治療も期待できた。
	N.K.	66 ♀	深部 3 3 6 5	Ps. gingivalis C. rectus		60日	投与15日目頃より症状は緩和し始め、原因菌は21日目には検出されず、排膿も出血も止まり、固いものも食べられるようになった。60日目には歯周ポケット内の肉も少々盛り上がり、その容積は凡そ半分位になった。歯肉の色調も回復し、歯のグラツキも収まり、治療を続けることにより、抜歯をせずに治療も充分期待できた。

【0066】

(比較例2)

歯周病患者8名を1グループ2名としてA～Dの4グループに分け、Aグループでは、抗生物質のみを投与または症状に応じて、消炎酵素剤も併用した。Bグループでは、抗生物質とともに製造例1の方法で製造したオリジナルのラクトバチラス カゼイ種の凍結乾燥菌製剤と製造例3の方法で製造した菌製剤とを等量ずつ混合した製剤とを併用した。Cグループでは、初期の段階は抗生物質または消炎酵素剤とを投与し、その後は上記菌製剤を使用した。Dグループは、治療当初から抗生物質は一切用いず、菌製剤のみを投与した。なお、本比較例は特開2001-333766号公報の試験例2の歯周病患者（歯槽膿瘍および歯肉炎の患者に相当）に該当するものであり、その結果を表14（特開2001-333766号公報表7～10の一部に該当）に示した。

【0067】

【表15】

表 14. オリジナルノラクトバチラス カゼイ種に対する治療成績

治療 方法	患者		病名	主な起炎菌	抗生物質 (略名)	投与期間	治療経過と成績
	年齢	性別					
A	45	♂	歯槽膿瘍 7	Sta. aureus Str. pyogenes	セファロ CCL		20日間投与したが、殆ど良くなり、全く改善のきざし認められなかった。
	27	♀	歯肉炎 5 5	Bac. fragilis Sta. aureus	セファロ CCL		投与7日目から症状は僅かずつ好転したが、口臭、腫脹は変わらず、21日目では症状は緩和されたものの、より効果的な処方が必要と認められた。
B	22	♀	歯槽膿瘍 8	Sta. aureus Str. pyogenes	セファロ CCL	45日	投与7日目から症状は僅かずつ良くなり、30日目で口臭はほぼ消失し、歯茎の色調も良くなった。45日目では完治したとは認め難いが、症状は良好し、投与を継続することにより完全治癒が期待できた。
	62	♂	歯槽膿瘍 7 5 6	Fuso. faciforme Sta. aureus	セファロ CCL	45日	投与10日目から症状が軽快となり始め、日数の経過と共に良くなり、45日目では口臭は減弱し、歯茎の色調も可成り改善され、完治したとは認め難いが、症状は良好し、投与を継続することにより完全治癒が期待できた。
C	72	♀	歯槽膿瘍 6 5 4	Bacte. melami- nogenicus Str. pyogenes	アモキシ AMP C	45日	投与4日目から症状は僅かずつ良くなり、45日目では口臭は消失し、歯茎の色調も良くなった。投与を継続することにより完全治癒が期待できた。
	28	♀	歯槽膿瘍 7	Bacte. fragilis Sta. aureus	テトラサイ TC	60日	投与5日目から症状は僅かずつ良くなり、60日目では口臭は消失し、歯茎の色調も可成り回復した。投与を継続することにより完全治癒が期待できた。
D	44	♀	歯槽膿瘍 4	Sta. aureus		60日	投与10日目から症状は僅かずつ良くなり、60日目には口臭が消失し、歯茎の色調も回復した。投与を継続することにより、完全治癒が期待できた。
	20	♂	歯槽膿瘍 4 5	Fuso. faciforme Str. pyogenes		60日	投与10日目から症状は軽快となり始め、30日目には原因菌を検出できなかった。60日目には完全に治癒した。

【0068】

(実施例 9)

慢性感染症として、慢性副鼻腔炎、慢性気管支炎および褥瘡について、治療試験を実施した。Aグループでは、抗生物質のみを投与または症状に応じて、消炎酵素剤も併用した。慢性副鼻腔炎には、主として抗生物質製剤を懸濁した水溶液で鼻腔を洗浄し、褥瘡については清拭後患部に抗生物質製剤を塗布した。その治療成績を表15-1に示した。Bグループでは、抗生物質とともに製造例1で製造した凍結乾燥菌製剤 (FERM P-19443) と製造例3で製造した乳酸菌製剤 (FERM P-19443) とを等量ずつ混合した製剤を使用した。乳酸菌製剤の基本的な投与方法は慢性副鼻腔炎の場合、凍結乾燥菌体を温湯 1 L 当たり 2 g を懸濁させて鼻腔洗浄を行った。褥瘡の場合は凍結乾燥菌体を褥瘡部に塗布または振りかけた。その治療成績を表15-2に示した。Cグループでは、初期の段階は抗生物質または抗生物質と消炎酵素剤とを投与し、その後は上記乳酸菌製剤を使用した。その治療成績を表15-3に示した。Dグループは、治療当初から抗生物質は一切用いず、乳酸菌製剤のみを投与した。その治療成績を表15-4に示した。なお、治療に当たり、慢性感染症の主要な原因菌を分離し、薬剤感受性テストを行い、その結果を踏まえて各々最適な抗生物質を使用した。表15-1～表15-4から明らかなように、抗生物質では治療し難い慢性感染症に本発明の乳酸菌製剤を用いて高い治療効果が得られた。特に、抗生物質とその耐性を有する本発明の乳酸菌製剤との併用は一段と有効性を発現した。下記に示すオリジナルのラクトバチラス カゼイ種による治療成績と比較して一段と良好に推移した。

【0069】

【表 16】

表 15-1. 本発明のラクトバチラス カゼイ種 に対する治療成績

治療 方法	患者		病名	主な起炎菌	抗生物質	治療経過と成績	
	年齢	性別					
A	28	♂	慢性 副鼻腔炎	Str. pneumoniae	アモキシリン AMPC	鼻洗浄直後は状態が良くなるが、結局一進一退。10日間投与したが、症状は殆ど改善されず、原因菌は相変わらず検出された。	
	44	♀	慢性 副鼻腔炎	Str. pneumoniae	クラリスリン TC	15日間投与するも改善のきざしは全く認められなかった。	
	52	♀	慢性 気管支炎	Sta. aureus	アモキシリン AMPC	投与5日目頃からカゼ症候群は幾分か良くなったがセキやのどの痛みは変わらず、2週間の投与で全体の症状は緩和されたが、より効果的な処方が必要と認められた。原因菌は少なくなったが未だ検出された。	
	38	♂	慢性 気管支炎	Bacte. catarrhalis	スロキサリン リン酸塩 TFLX	上に同じ	
	77	♀	褥瘡 (浅い)	Kleb. pneumoniae	クラリスリン OFLX	2週間の塗布で患部面積は半分位になったが、皮の再生には到らず、1ヶ月間の投与でようやく薄皮が再生された。	
	74	♂	褥瘡 (深い)	Ps. aeruginosa	クラリスリン OFLX	2週間の塗布で幾分か良化のきざしが見え始めたが、その後は一進一退、なかなか改善されず、いつまでも膿や漿液が分泌されていた。	

【0070】

【表17】

表15-2. 抗生物質及び本発明のラクトバチラス カゼイ種による慢性感染症に対する治療成績

治療 方法	患者		病名	主な原因菌	抗生物質	使用薬剤	治療経過と成績
	年齢	性別					
B	25	♀	慢性 副鼻腔炎	Str.pneumoniae	クラリスロマイシ ン CAM	本発明の 乳酸菌製 剤	投与5日目頃より良くなり始め、15日目には原因菌は消滅した。30日目には自覚症状は殆どなくなり、病理所見、レントゲン検査では殆ど治癒したと認められた。
	37	♂	慢性 副鼻腔炎	Str.pneumoniae Str. pyogenes	クラリスロマイシ ン CAM	本発明の 乳酸菌製 剤	投与3日目頃より急速に軽快たなり、15日目には原因菌は検出されず、30日目には病理所見、レントゲン検査及び自覚症状とも治癒が確認された。
	48	♀	慢性 気管支炎	Str.pneumoniae	マクロリジン OFLX	本発明の 乳酸菌製 剤	投与5日目頃より症状は良くなり始め、30日間の投与で咳は僅かに残るが、その他のカゼ症状群はほぼ消失した。原因菌は7日目には検出されなかった。
	55	♂	慢性 気管支炎	K. pneumoniae	トリスチリン トシ酸塩 TFLX	本発明の 乳酸菌製 剤	上に同じ
	69	♂	褥瘡 (浅い)	P. vulgaris	ミノサイクリン MINO	本発明の 乳酸菌製 剤	1週間の塗布で患部の面積は半減し、2週間の塗布で薄皮が再生され、分泌物も消失し、良化した。
	81	♀	褥瘡 (深い)	Str. pyogenes	アモキシシリン AMPC	本発明の 乳酸菌製 剤	1週間の塗布で肉芽が出現して、2週間の塗布でさらに盛り上がり、3週間で患部面積は半減し、4週目で全体に薄皮が再生した。

【0071】

【表18】

表15-3. 本発明のラクトバチラス カゼイ種による慢性感染症に対する治療成績

治療 方法	患者		病名	主な原因菌	抗生物質	使用薬剤	治療経過と成績
	年齢	性別					
C	33	♀	慢性 副鼻腔炎	Str.pneumoniae	クラリスロマイ ン CAM	本発明の 乳酸菌製 剤	抗生物質投与中(1週間)は殆ど症状に変化はなかったが、本剤投与を始めてから急速に良好化し、30日目には自覚症状が殆どなくなり、検査では治療が確認された。
	47	♀	慢性 副鼻腔炎	Sta. aureus Str.pneumoniae	クラリスロマイ ン CAM	本発明の 乳酸菌製 剤	上に同じ
	59	♂	慢性 気管支炎	Str. pyogenes Kleb. pneumoniae	オキサリ ン OFLX	本発明の 乳酸菌製 剤	抗生物質投与中(5日間)は余り効果を示さなかったが、本剤の投与により良好化し始め、15日目にはカゼ 症候群も収まり、30日目にはほぼ収まった。原因菌 は12日目には検出されなかった。
	40	♂	慢性 気管支炎	Str.pneumoniae	オキサリ ン OFLX	本発明の 乳酸菌製 剤	抗生物質投与により症状は僅かに良くなった。その後 本剤投与で急速に良好化し、30日目には完全治癒した。 原因菌は10日目に消失した。
	65	♂	褥瘡 (浅い)	Enterococcus	テトラサイクリ ン TC	本発明の 乳酸菌製 剤	抗生物質1週間の塗布で患部面積はほぼ半減した。そ の後本剤塗布により分泌物は次第に少なくなり、1週 間後には薄皮が再生された。
	68	♀	褥瘡 (深い)	Str. pyogenes	ミノサイクリ ン MINO	本発明の 乳酸菌製 剤	抗生物質2週間の塗布により肉が少し盛り上がったが、 患部面積は変わらず、本剤の塗布により1週間で患部 は半減し、分泌物も漸次減少し、4週間で患部はほ ぼ塞がり全体に薄皮が張った。

【0072】

【表19】

表15-4. 本発明のラクトバチラス カゼイ種による慢性感染症に対する治療成績

治療 方法	患者		病名	主な原因菌	抗生物質	使用薬剤	治療経過と成績
	年齢	性別					
D	22	♂	慢性 副鼻腔炎	Sta. aureus		本発明の 乳酸菌製 剤	投与5日目位より漸次良くなり始め、30日目には原因菌は検出されず、50日目には病理所見もレントゲン検査でも、ほぼ完治と認められた。
	42	♂	慢性 副鼻腔炎	Str.pneumoniae		本発明の 乳酸菌製 剤	上に同じ
	65	♀	慢性 気管支炎	Kleb. pneumoniae		本発明の 乳酸菌製 剤	投与5日目頃より症状は軽快となり、50日目には症状はほぼ消失し、回復したと認められた。
	56	♂	慢性 気管支炎	Str.pneumoniae Str. agalactiae		本発明の 乳酸菌製 剤	上に同じ
	73	♂	梅毒 (浅い)	Ps. aeruginosa		本発明の 乳酸菌製 剤	2週間の塗布で患部面積はほぼ半減した。その後本剤塗布により分泌物は次第に少なくなり、3週間後には薄皮が再生された。
	78	♀	梅毒 (深い)	Enterococcus Sta. aureus		本発明の 乳酸菌製 剤	1週間の塗布で肉芽が少し発生し、その後は急速に肉が盛り上がり、4週目には薄皮が形成された。その跡はこれまでになく、非常に美しかった。

【0073】

(比較例 3)

慢性副鼻腔炎患者 8 名並びに慢性気管支炎患者 8 名を 1 グループ 2 名ずつ A～D の 4 グループに分け、A グループでは、抗生物質のみを投与または症状に応じて、消炎酵素剤も併用した。B グループでは、抗生物質とともに製造例 1 の方法で製造したオリジナルのラクトバチラス カゼイ種の凍結乾燥菌製剤と製造例 3 の方法で製造した乳酸菌製剤とを等量ずつ混合した製剤を使用した。C グループでは、初期の段階は抗生物質または抗生物質と消炎酵素剤とを投与し、その後は上記乳酸菌製剤を使用した。D グループは、治療当初から抗生物質を一切用いず、乳酸菌製剤のみを投与した。なお、本比較例は特開 2001-333766 号公報の試験例 2 の慢性副鼻腔炎および慢性気管支炎に該当するものであり、その結果を表 16-1 および表 16-2 (特開 2001-333766 号公報表 7～10 の一部に該当) に示した。

【0074】

【表 20】

表16-1. オリジナルのラクトバチラス カゼイ種による慢性感染症に対する治療成績

治療 方法	患者		病名	主な原因菌	抗生物質	投与期間	治療経過と成績
	年齢	性別					
A	18	♀	慢性 副鼻腔炎	Str.pneumoniae	アモキシ ABPC		投与10日目から自覚症状は変わらないが、病的所見 やレントゲン検査では、少し良くなった。20日目では 状態が悪い方に進みだした。
	20	♂	慢性 副鼻腔炎	Str.pneumoniae Sta. aureus	クラリスロマイ ン CAM		20日間投与したが、殆ど良くならず、全く改善のき ざしが認められなかった。
	62	♂	慢性 気管支炎	Sta. aureus Kleb.pneumoni ae	クラリスロマイ ン OFLX		投与5日目からカゼ症候群はかなり良くなったが、の どの痛みは残り、咳も出た。21日目では症状は緩和 されたものの、より効果的な処方が必要と認められた。
	50	♀	慢性 気管支炎	Sta. aureus Str.pneumoniae	クラリスロマイ ン OFLX		上に同じ
B	18	♀	慢性 副鼻腔炎	Str.pneumoniae	クラリスロマイ ン CAM	45日	投与7日目から症状が急速に良くなり、30日目には 原因菌を検出できなくなった。45日目には病的所見、 レントゲン検査および自覚症状とも治癒を確認した。
	35	♂	慢性 副鼻腔炎	Str.pneumoniae Str. pyogenes	クラリスロマイ ン CAM	45日	投与4日目から症状が急速に良くなり、45日目には 病的所見、レントゲン検査ではほぼ治癒したが、自覚 症状は未だ存在した。投与を継続することにより完全 治癒が期待できた。
	45	♀	慢性 気管支炎	Bran.catarhalis Sta. aureus	クラリスロマイ ン OFLX	45日	投与7日目から症状は僅かずつ良くなり、45日目では はどの痛みが残るが、その他のカゼ症候群は軽快と なり、投与を継続することにより完全治癒が期待でき た。
	72	♀	慢性 気管支炎	Str.pneumoniae	クラリスロマイ ン OFLX	45日	投与7日目から症状は軽快となり始め、45日目では完 全に治癒したことが認められた。

【0075】

【表 21】

表 16-2. オリジナルのラクトバチラス カゼイ種による慢性感染症に対する治療成績

治療 方法	患者		病名	主な原因菌	抗生物質	投与期間	治療経過と成績
	年齢	性別					
C	33	♀	慢性 副鼻腔炎	Str.pneumoniae	クラリスロマイシ ン CAM	60日	投与5日目から症状は僅かずつ良くなり、40日目には原因菌は検出できなかった。60日目には病的所見やレントゲン検査では可成り良くなり、自覚症状でも軽快し、投与を継続することにより完全治癒が期待できた。
	45	♂	慢性 副鼻腔炎	Str.pneumoniae Sta. aureus	クラリスロマイシ ン CAM	60日	投与3日目から症状は軽快となり始め、日数の経過と共に良くなり、60日目には病的所見やレントゲン検査では軽快し、自覚症状も消失し、投与を継続することにより完全治癒が期待できた。
	47	♂	慢性 気管支炎	Str.pneumoniae	オロキザン OFLX	60日	投与5日目から症状は僅かずつ良くなり、60日目で咳以外のカゼ症候群は消失した。投与を継続することにより完全治癒が期待できた。
	52	♀	慢性 気管支炎	Bran.catarrhalis	オロキザン OFLX	60日	投与7日目から症状は僅かずつ良くなり、60日目で咳以外のカゼ症候群は消失した。投与を継続することにより完全治癒が期待できた。
	39	♂	慢性 副鼻腔炎	Str.pneumoniae		60日	投与5日目から症状は僅かずつ良くなり、60日目には病的所見やレントゲン検査では、軽快し、自覚症状も殆どなかった。投与を継続することにより完全治癒が期待できた。
D	48	♂	慢性 副鼻腔炎	Str.pneumoniae		60日	投与10日目から症状は急速に良くなり、60日目に完全治癒した。
	62	♀	慢性 気管支炎	Sta. aureus Kleb.pneumoni ae		60日	投与7日目から症状は軽快となり始め、60日目には殆ど症状が消え、回復した。投与を継続することにより完全治癒が期待できた。
	68	♀	慢性 気管支炎	Str.pneumoniae		60日	上に同じ

【0076】

(実施例 10)

感染症ではないが、便秘症、下痢症、糖尿病、感染症ではない疾患、慢性疲労症候群、アトピー性皮膚炎、低血圧症、神経症、高血圧症などの慢性的疾患を有する患者に対して、製造例 2 の方法で製造した凍結乾燥菌体制剤 (FERM BP-6971) 20 g を 100 g の乳糖に混和させたものを 1 日 2 g 投与した。このときの菌投与量は 1×10^{10} cells/g が 2 g/日であった。本発明の乳酸菌製剤 (FERM P-19443) を投与した治療試験は、同一または類似の症状を呈する患者それぞれ 10 名に対して 2 ヶ月間投与し、そのときの平均的な改善状態を表 17 に示した。本発明の乳酸菌製剤を投与しても、症状が全く改善されない患者が約 15% いたが、症状が悪化した患者は皆無であった。表 17 に記載した慢性疾患以外にも、例えば動脈硬化症、痛風、肥満症、慢性肝炎など多くの慢性病に程度の差はあっても有効なことが実証された。表 17 から明らかなように、本発明の乳酸菌製剤の働きが妨害を受けずに 100% 発揮されるならば、生体の自然治癒力が増大し、生命力を賦活する。例えば、経口投与により腸内が浄化されたならば、必然的に血液が浄化され、全身くまなくホルモン、酵素、抗体、免疫物質などの生体必須物質が運ばれ、新陳代謝がスムーズになり、全身機能が好転し、病気とは凡そ縁のない生活を全うできることを意味するからである。正にメチニコフの唱えた不老長寿説を一世紀のときの流れを経て具現したものといえよう。

【0077】

【表 22】

表 17. 慢性疾患に対する経過状況

慢性疾患	本発明の乳酸菌製剤投与による症状の経過	
	2ヶ月目の成績 ¹⁾	経過状況
便秘症	○ ~ ◎	投与3日目頃から症状が軽快となり始め、日数の経過と共に良くなり、15日目にはほぼ解消して良い状態が続いた。
下痢症	◎	投与2日目から下痢が収まり、10日目にはほぼ解消した。その後さらに状態が良くなり、1ヶ月目には極めてよく改善された。
糖尿病	○	平均185mg/dlの血糖値が投与1ヶ月後には150に、2ヶ月後には140mg/dlになった。
感染症でない疾患	△ ~ ○	投与1ヶ月頃より徐々に良くなり始め、その後も徐々に良化、2ヶ月目には余り気にならなくなった。
慢性疲労症候群	◎	投与7日目頃より徐々に疲労感が薄れ、1ヶ月経過した時点でほぼ解消した。
アトピー性皮膚炎	△ ~ ○	長年にわたり苦しんでいたアトピーの症状も15日目頃より徐々に改善され、2ヶ月目には大分良くなった。
低血圧症	◎	投与6日目頃より(55~95mmHg)が上がり始め、1ヶ月後(60~100mmHg)、2ヶ月後(65~110mmHg)と正常域になった。
神経症	△	投与1ヶ月目頃より、不安、強迫、恐怖、ヒステリー等の症状がやわらぎ始め、軽快となる。2ヶ月目には、これらの精神障害も余り気にならなくなった。
高血圧症	△ ~ ○	投与15日目頃より血圧(最高血圧175mmHg)が下がり始め、1ヶ月後150mmHgとなり改善された。なお、降圧剤と併用することで、さらに改善された。

1) 治療成績

- ◎: 極めて改善され、健康に復したか、あるいはこれに準じ得たと判定できるもの。
 ○: 完全な健康状態に復したとは認めがたいが、状態が良くなり、本製剤の投与継続により、完全治療が想定されるもの。
 △: 幾分か快方に向かうが、より効果的な何らかの処方が必要と認められるもの。
 ▲: 一時症状は良くなるが、やがて元の状態に戻るもの。

【0078】

(実施例11)

平均体重18kgの2ヶ月齢のランドレース種子豚を雌雄各10頭ずつを3区に分けた。飼育環境は個室の無窓豚舎であり、換気扇にて換気を行った。餌は子

豚用標準飼料（日本農産工業株式会社製）にて飼育した。餌は不断給餌で、餌が餌箱に絶えず残っている状態とし、給水は給水器による自動給水とした。対照区には餌にオリジナルのラクトバチラス カゼイ種（FERM BP-6971）を、試験区には本発明のラクトバチラス カゼイ種（FERM P-19443）を、それぞれの湿潤菌体を $1 \times 10^6 \text{ cells/g}$ 飼料になるように添加調整したものを与え、さらに乳酸菌を与えない無添加区を設けた。上記の飼育条件で1ヶ月間飼育した結果、表18に示したように本発明のラクトバチラス カゼイ種を添加した試験区の子豚は、無添加区に比較して、毛艶も良く、平均で4.8kgも重く、明らかな成長促進効果がみられた。子豚がよく罹患する下痢などの症状も全くみられず、試験以降も病気には無縁で順調に飼育することができた。さらには、糞の臭気の低下も確認された。なお、オリジナルのラクトバチラス カゼイ種を添加した対照区も良好な成績を得たが、試験区に比較すると可成り見劣りがした。また、専門家による肉質検査においても、試験区の豚は特に赤身が多く、弾力性があり、非常に良質であるとの判定を得た。

【0079】

【表23】

表18. 子豚の飼育試験成績

	無添加区	対照区	試験区
開始時の平均体重	18.2kg	18.0kg	17.8kg
1週後の平均体重	21.2kg	21.0kg	21.4kg
2週後の平均体重	25.5kg	26.1kg	26.9kg
3週後の平均体重	31.3kg	32.5kg	34.0kg
4週後の平均体重	38.8kg	40.2kg	43.2kg
平均体重増	20.6kg	22.2kg	25.4kg
飼料摂取量	42.2kg	43.8kg	43.7kg
飼料要求率	2.05	1.97	1.72

【0080】

(実施例12)

ブロイラー専用種（アーバーエーカー）の初生雛（平均体重43g）の雌雄各30羽を3日間予備飼育後、雌雄が同数になるように3区に分け、各区の平均体重を50gとし、体重にバラツキがないことを確認した。これにブロイラー肥育

前期用標準飼料（協同飼料株式会社製、ゴールデンG）を4週間給餌した。飼育環境は4週齢までバタリー飼育した（保温飼育35℃±2℃）。対照区には標準飼料にオリジナルのラクトバチラス カゼイ種（FERM BP-6971）の凍結乾燥菌体を、試験区には本発明のラクトバチラス カゼイ種（FERM P-19443）の凍結乾燥菌体を、それぞれ 2×10^7 cells/g - 飼料になるように添加した。さらに乳酸菌を与えない無添加区を設けた。飼育は給水器による自由給水とし、餌は不断給餌で絶えず、餌が残っている状態を維持した。結果を表19に示したが、表19から明らかなように4週間の飼育の結果、無添加区に比べ、対照区では約15%、試験区では約27%もの体重の増加が認められた。また、飼育期間を通して、試験区では病気の発生もなく、下痢などの症状もみられず、糞の臭気も軽減していることが確認された。このことから、本発明のラクトバチラス カゼイ種による乳酸菌製剤はオリジナルのラクトバチラス カゼイ種による乳酸菌製剤よりも格段に良い成績を示すことがわかった。

【0081】

【表24】

表19. プロイラーの飼育試験成績

	無添加区	対照区	試験区
開始時平均体重	50.5 g	50.0 g	49.5 g
1週齢の平均体重	162 g	173 g	180 g
2週齢の平均体重	380 g	405 g	425 g
3週齢の平均体重	696 g	735 g	779 g
4週齢の平均体重	985 g	1142 g	1238 g
飼料摂取量	1710 g	1850 g	1880 g
飼料要求率	1.8	1.7	1.6

【0082】

(実施例13)

平均魚体重約65gのサバの幼魚100尾を養殖している小割り漁網生け簀を4生け簀使用し、その内の3生け簀を試験区、1生け簀を無添加区とした。餌料として、市販のハマチ用配合餌料（日清飼料株式会社製、イトメイト）とイワシのミンチを1:1で混合したモイストペレットを与えた。試験区1には本発明の

ラクトバチラス カゼイ種 (FERM P-19443) の乾燥菌体を 1×10^9 cells/g-餌料になるように混合してすぐに投与した。試験区 2 には同じく本発明のラクトバチラス カゼイ種 (FERM P-19443) の培養液を 0.02 ml/g-餌料になるように添加したものを与えた。試験区 3 には同じく本発明のラクトバチラス カゼイ種 (FERM P-19443) の培養液を 0.02 ml/g-餌料になるように添加したものを与えた。なお、試験期間中の水温は 20℃～22℃であった。試験結果を表 20 に示した。表 20 から明らかなように、無添加区に比べて、試験区のサバは、成長もよく、試験期間中の死亡数も少なかった。なかでも、本発明のラクトバチラス カゼイ種の培養液を与えた試験区 2 の成績が一番良好であった。

【0083】

【表 25】

表 20. 本発明の乳酸菌製剤によるサバの飼育試験成績

	無添加区	試験区 1	試験区 2	試験区 3
開始時平均体重	65 g	64 g	65 g	66 g
終了時平均体重	240 g	280 g	290 g	255 g
平均体重増	175 g	216 g	225 g	189 g
総餌料摂取量	275 kg	275 kg	275 kg	275 kg
成長率	270 %	338 %	346 %	286 %
死亡尾数	7	1	1	2

【0084】

(比較例 4)

実施例 13 と同様の試験をオリジナルのラクトバチラス カゼイ種 (FERM B P-6971) を用いて実施し、その結果を表 21 に示した。表 21 から明らかなように、本発明のラクトバチラス カゼイ種の場合と比べると、可成り見劣りのする結果であった。

【0085】

【表26】

表21. オリジナルのラクトバチラス カゼイ種による
乳酸菌製剤によるサバの飼育試験成績

	試験区1	試験区2	試験区3
開始時平均体重	65 g	64 g	67 g
終了時平均体重	265 g	275 g	250 g
平均体重増	200 g	211 g	183 g
総餌料摂取量	275 kg	275 kg	275 kg
成長率	307 %	330 %	273 %
死亡尾数	1	2	2

【0086】

(実施例14)

トリの餌や釣りの餌として重宝されているシマミミズの養殖実験を行った。W 600 mm×D 400 mm×H 150 mmの木箱を4個用意し、各箱に腐葉土1 kgに生のパン酵母0.5 gを混和したものを8分目入れ、次いで平均体長10 mm、平均体重40 mgの幼ミミズを各箱に100匹ずつ投入した。室温25℃に設定した室内で飼育し、昼は電灯を10ルクスで照射し、夜間は消灯した。試験区1には本発明のラクトバチラス カゼイ種 (FERM P-19443) の湿潤菌体0.01 gを、試験区2には本発明のラクトバチラス カゼイ種 (FERM P-19443) の培養液を水で100倍に希釈したものを200 ml、試験区3には本発明のラクトバチラス カゼイ種 (FERM P-19443) の培養液を200 ml撒布した。この作業を10日に1回行い、無添加区には水のみを撒布した。いずれの飼育箱も土壌が乾燥しない程度に2日毎に水を適量撒布した。餌としてドライイーストとクロレラを毎週1回投与し、飼育開始時は各1 gずつ、1週経過する毎に20%ずつ増量した。3ヶ月後の飼育成績を表22に示した。表22から明らかなように、無添加区に比較して、試験区1および試験区2では歩留まりもよく、体重も20%程度増大した。試験区3の場合もこれらに準ずる成績であった。

【0087】

【表 27】

表 22. シマミミズの養殖試験成績

	無添加区	試験区 1	試験区 2	試験区 3
開始時の平均体長	27 mm	32 mm	33 mm	30 mm
開始時の平均体重	170 mg	210 mg	230 mg	200 mg
無添加区に比較しての体重増	—	18.5% 増	22.0% 増	11.0% 増
歩留まり	77%	98%	95%	80%

【0088】

上記に示したミミズ以外にも、カブトムシの幼虫、カイコの幼虫などの飼育実験を実施したが、試験区のものは成長が早く、しかも大きく育った。これに伴いまゆも成虫も大きくなった。なお、上記各種実験をオリジナルのラクトバチラス カゼイ種を用いて実施しても良好な成績を得たが、本発明のラクトバチラス カゼイ種の場合に比較すれば、その成長率、歩留まりともに平均 5～10% 低かった。

【0089】

(実施例 15)

ハウス栽培で最もポピュラーで厄介でもある、うどん粉病およびベト病の予防並びに治療に関する試験をキュウリを用いて実施した。うどん粉病は糸状菌が葉や茎の表面から侵入し、初めは白い小斑点をつくり、症状が進むと葉一面に白い粉をまぶしたような状態となり、次第に灰色に変わる。葉の生長は止まり、キュウリの場合、細く小さな固い実しか収穫できない。また、ベト病は最初葉裏に灰白色のカビ状の病斑が現れて、次第に葉の表面が汚れたような不規則な紋が生じ、それが大きくなっていく。最終的には葉が黄褐色のべとべと状態となり腐って収穫は期待できない。

【0090】

キュウリのハウス栽培の一面を完全に仕切り、本発明のラクトバチラス カゼイ種 (FERM P-19443) の乾燥菌体 1 g を水 1 L の割合で混和させた液 (2×10^7 cells/ml) を開花前の葉や茎に万遍なく撒布した。1週間後にうどん粉病菌 (*Sphaeratheca fuliginea*) とベト病菌 (*Pseudoperonospora cubensis*) の孢子

を病気発生に十分な量を撒布したが、罹患せずに開花し、通常よりむしろ大振りで立派なキュウリが次々と収穫できた。なお、本発明の乳酸菌製剤を撒布せずに、病原菌の胞子を撒布したキュウリは双方いずれかの病気に罹った。また、オリジナルのラクトバチラス カゼイ種 (FERM BP-6971) より得られた凍結乾燥菌体を撒布したキュウリは一部に病気が発生し、罹患したものは収穫できなかった。その割合は全体の 10%~20% を占めた。

【0091】

上記において罹患したキュウリのごく初期の段階で本発明のラクトバチラス カゼイ種 (FERM P-19443) の乾燥菌体 5 g を水 1 L に懸濁した菌液 (1×10^8 cells/ml) をスプレーで充分撒布し、1 週間後再度同量撒布したところ、病斑は次第に消失し、通常とおり開花し、立派な実を付けた。なお、オリジナルのラクトバチラス カゼイ種 (FERM BP-6971) を同様に撒布した場合は、約 50% の割合で病気は治まったが、残りの 50% はそのまま病気が進行し、結果として収穫できなかった。

【0092】

上記のキュウリ以外の作物、例えばジャガイモ、ピーマン、カボチャなどについても同様に実験を行ったが、いずれも本発明のラクトバチラス カゼイ種の乾燥菌体の撒布は、有効であることが実証された。例えば、3% チオファネートメチル (日本曹達株式会社製、トップジン M) やキノキサリン (株式会社八洲化学製、モレスタン) などの農薬の撒布を通常の $1/2 \sim 1/3$ に減少して、その後本剤を適量投与しても好成績が得られた。

【0093】

(実施例 16)

W 600 mm × D 400 mm × H 150 mm のプランター 4 個を用意し、それぞれの下層土に化成肥料 (株式会社ナック製、化成 38 号、N: 8%、P: 5%、K: 5%) 20 g および溶性リン肥 5 g を混ぜて入れ、その上に通常の畑の土壌に対して腐葉土 30% の割合で混和した土壌 10 L に苦土石灰 (株式会社ナック製、消石灰に酸化マグネシウムを 5~7% 混和した土壌改良剤) 10 g を混和した土壌を 8 分目くらいの高さに入れた。10 月中旬にそれぞれのプランターに

Allso種のイチゴの苗を6株ずつ植え、2週間後から12月中旬頃まで、1週毎に液肥を施すと同時に試験区1のプランターには本発明のラクトバチラス カゼイ種 (FERM P-19443) の凍結乾燥菌体を水に懸濁させ (1×10^7 cells/ml)、霧吹きにてイチゴの苗全体に万遍なく吹きかけた。試験区2には本発明のラクトバチラス カゼイ種 (FERM P-19443) の培養液を水で200倍に希釈した液を撒布した。試験区3には本発明のラクトバチラス カゼイ種 (FERM P-19443) の培養液を水で200倍に希釈した液を撒布した。無添加区のプランターには水のみを撒布した。翌年3月、つぼみがでた時点で再び液肥と上記乳酸菌製剤を1週毎に撒布した。開花後1ヶ月~2ヶ月の間、赤く熟した実から漸次収穫した。その結果を表23に示した。表23から明らかなように、本発明の乳酸菌製剤を撒布した試験区1および試験区2のイチゴは生長が早いだけでなく、1株当たり200gのイチゴが収穫できた。その上、香り、色つや、味、大きさなどの品質はどれをとっても一級品として認められた。これに対して、無添加区のイチゴは、試験区の一級品に比較して、収穫量も少なく、品質も見劣りするもので、いわゆる並級と称せられるものであった。

【0094】

【表28】

表23. イチゴの生育試験成績

		無添加区	試験区1	試験区2	試験区3
開花後の収穫時期		35~60日	30~50日	30~50日	35~55日
1株当たりの収穫量		155g	185g	200g	175g
品質	大きさ	中	大	大	中~大
	香り	+	+++	+++	++
	色	黄~深紅色	深紅色	深紅色	深紅色
	艶	+	++	++	++~+++
	味	やや糖度に欠ける 少し水っぽい	糖度が高く、 酸味も程良い 非常に美味	左に同じ	糖度は高いが やや酸味に欠ける

【0095】

(実施例17)

W600mm×D400mm×H150mmのプランターを8個用意し、通常の畑の土壤に腐葉土を30%混合し、その10Lに対して、ミツバ用として苦土

石灰（消石灰に酸化マグネシウムを5～7%混和した土壌改良剤）8gを混ぜ、1週間後にプランター3個の下層土に化成肥料（株式会社ナック製、化成38号、N：8%、P：5%、K：5%）20gを施した。一方、ホウレンソウ用として苦土石灰20gを化成肥料（株式会社ナック製、化成38号、N：8%、P：5%、K：5%）20gとをよく混合し、プランター3個に収めた。次にそれぞれのプランターに種を9月下旬に筋蒔きした。ミツバ、ホウレンソウとも発芽した時点で二葉が重ならない程度に間引きし、本葉が伸びてきたときに、液肥を1週間に1回施し、水まきは土が乾燥しない程度に行った。なお、液肥の施肥と同時に試験区1には本発明のラクトバチラス カゼイ種（FERM P-19443）の乾燥菌体を水に懸濁し（ 1×10^7 cells/ml）、霧吹きにて全体に吹き付けた。試験区2には本発明のラクトバチラス カゼイ種（FERM P-19443）の培養液を水で300倍に希釈したものを同様に吹きかけた。試験区3には本発明のラクトバチラス カゼイ種（FERM P-19443）の培養液を水で300倍に希釈したものを吹きかけた。無添加区は水のみを吹きかけた。ミツバについての結果を表24に示した。表24から明らかなように、本発明のラクトバチラス カゼイ種を振りかけた試験区1および試験区2のミツバは生長が早く、葉は広く厚く、しかも柔らかで、市販されている水耕栽培のミツバとは比較にならない程、香りが良かった。また、試験区3のミツバも上記に準じて品質の良いものが採取できた。

【0096】

【表 29】

表 24. ミツバの生育試験成績

		無添加区	試験区 1	試験区 2	試験区 3
収穫状況		種蒔きから収穫まで（高さ 15 cm 以上）に 35 日を要した。 1 本当たりの重量は試験区 1 のミツバに比して 80 % 程度であった。収穫の時期が遅れると固い。	収穫まで 30 日を要した。収穫の時期が少し遅れても品質には問題なし。	収穫まで 28 日を要した。収穫の時期が少し遅れても品質には問題なし。	収穫まで 32 日を要した。収穫の時期が遅れると僅かながら固くなる。
品質	香り	+	++	+++	++
	その他	葉の広さ、厚さのいずれも並	葉は広く、厚いにも拘わらず柔らかで茎も柔らかい 葉の色は濃い	左に同じ	葉は並の広さであるが、葉、茎とも柔らかい

【0097】

ハウレンソウについての結果は表 25 に示した。表 25 から明らかなように、試験区のハウレンソウは無添加区に比較して、根は赤味が強く、張りも良く、葉は大きく厚みを有して、艶やかで独特の甘味を醸し出しており、緑の深い高品質のものに育った。無添加区には一部斑点病（葉に褐色病斑ができ、病斑上に黒褐色のカビがついて枯死する。）が発生したが、試験区では皆無であった。なお、上記以外にもキャベツ、パセリ、セロリなどの野菜類、ブドウ、オレンジなどの果物、マッシュルームなどの担子菌類、ポトスなどの観葉植物、カーネーションなどの花においても、比較実験を実施したが、いずれも無添加区に比べて早期に高品質のものが収穫できた。しかも、病気の罹患も殆どなかった。

【0098】

【表 30】

表 25. ホウレンソウの生育試験成績

	無添加区	試験区 1	試験区 2	試験区 3
収穫状況	種蒔きから収穫まで（本葉 5～6 枚出てくる頃）50 日を要した。	種蒔きから収穫まで 40 日を要した。	左に同じ	種蒔きから収穫まで 45 日を要した。
品質	特有の甘味がやや弱い感じ	葉は広く厚い艶が良く特有の甘味を有する	左に同じ	左に同じ

【0099】

(実施例 18)

ペパーミントの苗（本葉 6 枚）を購入し、畑の土壤に腐葉土を 50% 混入し、上記実施例 16 および実施例 17 と同様に試験区 1、試験区 2、試験区 3 および無添加区を設け、1 週毎に 1 回本発明の乳酸菌製剤（FERM P-19443）を霧吹きにて撒布した。これとは別に月 1 回液肥を施した。その結果、試験区 1、試験区 2 および試験区 3 のペパーミントは、無添加区に比較して、葉が密生し、独特の甘味を有する香りが高かった。上記以外のハーブ、例えばカモミール、セージ、ラベンダー、レモンバームなどについても実験を実施したが、ペパーミントと同様、それぞれのハーブ特有の香りが高いように感じられた。なお、上記の野菜やハーブに対する実験を特開 2001-333766 に使用した、オリジナルのラクトバチラス カゼイ種（FERM BP-6971）についても同様に実施し、優れた成績を示したが、その収穫量、品質、香り、病気の発生などを総合的に判定すれば、本発明のラクトバチラス カゼイ種（FERM P-19443）を撒布することによる成績には到底及ばなかった。

【0100】

【発明の効果】

現在は社会全般にわたり「安全性と安心感」が何よりも重要視される時代である。健康や医療も例外ではなく、欧米を中心に「プロバイオティクス」の考え方が台頭してきた。因みに、プロバイオティクスとは、共生物質を意味し、腸内に

棲み、体に有益な働きをする細菌などの微生物のことをいい、この細菌の力を利用して積極的に病気の予防や治療に役立てようとする考え方であり、主として乳酸菌やビヒズス菌などの体内における利用のことを指している。

【0101】

我々はいち早くこれらに取り組み、特異な能力を付与させたラクトバチラス カゼイ種からなる本発明の乳酸菌製剤を開発した。本剤はプロバイオティクスの最先端を歩むものとして、健康回復、維持、増進に極めて鮮明に作用するのみならず、感染症が慢性に移行して、現在の医学でもその治療に難渋している疾病に対して、同種の従来品には認められなかった高い治療効果を発現することができた。また、本発明の乳酸菌は抗生物質に耐性を有するので、抗生物質と併用することによって、より早い治療が実現可能である。この場合、抗生物質の投与量は必要最小限で充分であり、薬剤が本質的に有する様々な副作用や耐性菌の蔓延などの弊害を減少させることができる。これに加えて、高齢化社会の到来による成人病や加齢による慢性感染症の増加と、それに伴う医療費の膨大化が必至であるとき、これらの諸問題をも解決することのできる手段として、本発明の乳酸菌製剤の役割は、今後益々重要となろう。

【0102】

また、豚、ブイラー、サバ、虫類などの動物の飼育に際しても、本発明の乳酸菌製剤を投与することにより、動物の成長を促進することができるとともに、その品質の向上、病気の予防に寄与し、さらにはキンギョの水カビ病や穴あき病などの各種疾病に対しても高い治療効果を示すものである。

【0103】

さらに、イチゴ、ホウレンソウなどの野菜類やハーブなどの植物に対しても、本発明の乳酸菌製剤を撒布することによって、発育を促進することができ、しかも高品質のものを採取することができる。また、病気の発生を抑制することに加えて、キュウリのうどん粉病、ベト病などの植物の疾病の治療に対しても有効である。

【0104】

本発明の乳酸菌製剤の登場は、感染症には抗生物質または農薬という従来の固

定観念に風穴を開けたものとして、やがて認知され、今後の「プロバイオティクス」の発展に多大に寄与することは間違いない。

【書類名】 要約書**【要約】**

【課題】 プロバイオティクスとして生体に真に有用なラクトバチラスの育成と、治療に難渋する慢性感染症の病巣に定着・増殖し、原因菌を排除しながら強力な浄化能力を発揮し、感染症を治し得るラクトバチラスの育成とが課題であった。

【解決手段】 ラクトバチラス カゼイ種であって、次の主要な性質を有するものを育成し、上記課題を解決した。1) 発育に必要な窒素源として1種類乃至4種類のアミノ酸のいずれか1種の存在により発育が可能であること。2) 発育可能な培地に大腸菌と同じ菌数を接種し、37℃で嫌氣的に混合培養したとき、最終菌数が大腸菌の50%以上になること。3) 適当な培地で培養したとき、最終pHが4.0以下になり、且つ最高酸度が1.5%以上になること。4) 5%の胆汁酸塩に対して抵抗性を有すること。5) 抗生物質を産生していること。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	特願2003-203802
受付番号	50301263363
書類名	特許願
担当官	第五担当上席 0094
作成日	平成15年 7月31日

<認定情報・付加情報>

【提出日】 平成15年 7月30日

特願 2003-203802

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[599011263]

1. 変更年月日

1999年 6月17日

[変更理由]

住所変更

住 所

バハマ、ナッソー、ピーオーボックス エヌ7117

氏 名

ピーエイチピーエイチ カンパニーリミテッド